GALAKTOKINASE-AKTIVITÄT IN AMNIONZELLEN UND FIBROBLASTEN HETERO- UND HOMOZYGOTER TRÄGER DES GALAKTOKINASE-DEFEKTES UNTER VERSCHIEDENEN KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN

Hermann Leitner

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus der Kinderklinik im Dr. v. Haunerschen Kinderspital der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Galaktokinase - Aktivität in Amnionzellen und Fibroblasten hetero- und homozygoter Träger des Galaktokinase - Defektes unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt
von
Hermann Leitner
aus
Töging
München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr.J.Schaub
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.K.Betke
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.5.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Frau Dr.Y.S.Shin-Buehring gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Priv.-Doz.Dr.J.Schaub danke ich herzlich für alle Anregungen bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof.Dr.K.Betke danke ich für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen an der Kinderklinik der Universität München.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0038

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

EINLEITUNG 1

MATERIAL

1. Zellkultivierung 10
2. Zellaufbereitung 12
3. Proteinbestimmung 12
4. Vorbereitung der ^{14}C - Galaktose 13
5. Galaktokinase - Testansatz 14
6. Säulenchromatographie 15
7. Radioaktivitätsmessung 16

METHODEN

1. Zellkultivierung 17
2. Präparation der Amnionzellen und Fibroblasten 21
3. Leukozytenpräparation 23
4. Proteinbestimmung 24
5. Vorbereitung der ^{14}C - Galaktose 26
6. Galaktokinase - Testansatz 27
7. Präparation der Diäthylaminoäthyl - Cellulose 29
8. Säulenchromatographie, Radioaktivitätsmessung und Bestimmung der Enzymaktivität 30

ERGEBNISSE

1. pH - Optimum 32
2. Michaelis - Konstante (k_M) 34

3. Wachstumsabhängigkeit der Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten und Amnionzellen - 37

4. Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten 44

DISKUSSION 61

ZUSAMMENFASSUNG 70

LITERATUR 72

LEBENSLAUF 78

Die Galaktosämie, ein angeborener, hereditärer Defekt des Galaktose - Stoffwechsels, galt lange Zeit als ein einheitliches Krankheitsbild, das durch Hepatomegalie, Ikterus, Hirnschaden und Katarakt gekennzeichnet ist. Die erste Beschreibung einer Galaktosämie durch v. Reuß (27) stammt aus dem Jahre 1908. 1956 stellten Komrower et al. (13) bei Galaktosämie - Patienten einen erhöhten Galaktose - 1 - Phosphat - Spiegel in Erythrozyten fest, als dessen Ursache Kalckar et al. (11) noch im gleichen Jahr den Galaktose - 1 - Phosphat - Uridyltransferase - Mangel nachweisen konnten. Durch die Entdeckung mehrerer Varianten, die von Beutler's (1) Beschreibung der Duarte - Variante ihren Ausgang nahm, erfuhr das Krankheitsbild der Galaktosämie in den letzten Jahren eine deutliche Erweiterung.
Seit 1965 ist uns noch ein weiterer, eigenständiger, den Galaktose - Stoffwechsel betreffender Enzymdefekt bekannt. Es handelt sich um den von Gitzelmann (7) erstmals beschriebenen Galaktokinase - Mangel, der Gegenstand der folgenden Untersuchungen ist.

Die Galaktokinase (EC 2.7.1.6) ist neben der Galaktose - 1 - Phosphat - Uridyltransferase (EC 2.7.7.12) und der UDP - Galaktose - 4 - Epimerase (5.1.3.2) eines der drei Enzyme, die im Leloirstoffwechsel (Abb. 1) die Umwandlung der Galaktose zu Glukose ermöglichen. Die Kinase, definitionsgemäß ein Enzym, das einen

Phosphatrest von ATP auf eine andere Substanz überträgt, phosphoryliert hier im speziellen Fall das C_1 - Atom des Galaktose - Moleküls, so daß Galaktose - 1 - Phosphat entsteht.

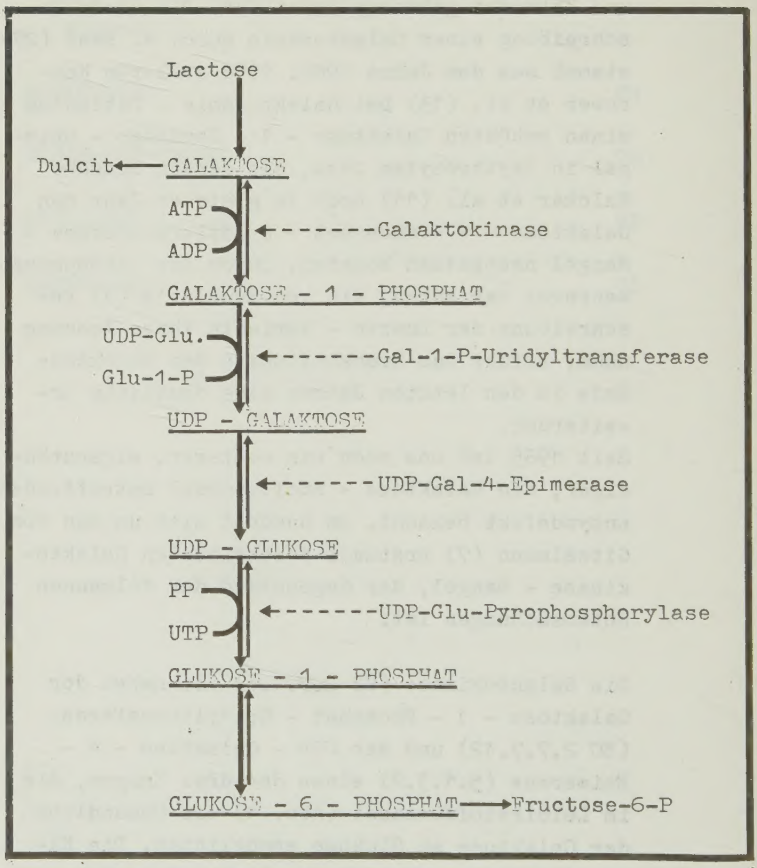

Abb. 1: Leloirstoffwechsel (Einzelstufen unterstrichen)

Fehlt dieses Enzym, wie es beim Galaktokinase - Defekt der Fall ist, so resultiert daraus ein Rückstau des nicht metabolisierten Substrates, nämlich der Galaktose, deren Blutspiegel dann deutlich erhöht ist. Der alternative Abbauweg, der daraufhin beschritten wird, führt mittels Reduktion durch eine Aldosereduktase zum Galaktitol (Dulcit). Dies scheint die eigentlich toxisch wirkende Verbindung zu sein, die sich bei Patienten mit Galaktokinase - Defekt in der Linse des Auges anreichert und darüber hinaus im Harn nachgewiesen werden kann.
Am Auge manifestiert sich die Krankheit deshalb, weil die Konzentration an Galaktose im Kammerwasser, die bei Gesunden relativ gering ist, enorm zunimmt und damit zu einer vermehrten Aufnahme in die Linse führt, wo sie durch die Aldosereduktase, für die hier eine hohe Aktivität gefunden wurde, rasch zu Galaktitol reduziert wird. Da Galaktitol osmotisch wirksam ist, kommt es, begleitet vom Zusammenbruch der Kationen - Pumpe, zum Wassereinstrom und zum Quellen der Fasern, d. h. zur Kataraktbildung.
Vom Ausmaß dieser Quellung abhängig, erweist sich die Rückbildungsfähigkeit der Katarakte unter entsprechender Behandlung. Diese Erkenntnisse über die Entstehung der Galaktose - induzierten Katarakte haben Arbeiten von Kinoshita et al. (12) und Pau et al. (24) in den Jahren 1962 bzw. 1973 erbracht.

Blind, aufgrund in früher Kindheit entstandener Katarakte, war auch der 9 - jährige Patient, bei dem Fanconi (5) 1933 die Diagnose "Galaktose - Diabetes" und Neurofibromatosis stellte. 1965 konnte Gitzelmann (7) den Galaktokinase - Defekt an ihm nachweisen.
Der zum Zeitpunkt der Entdeckung der Krankheit 43 - jährige Zigeuner zeigte trotz regelmäßiger Galaktoseaufnahme (er trank pro Tag etwa ein bis zwei Liter Milch) keinerlei Anzeichen einer Leberschädigung oder einer verminderten Intelligenz. Lediglich der Nachweis einer Hypergalaktosämie und Hypergalaktosurie konnte als Auswirkung des biochemischen Defektes erbracht werden. Quantitative Studien (8) bewiesen, daß nach Zufuhr von Galaktose, diese zu 2/3 im Urin ausgeschieden wurde; und zwar 4/5 unverändert als Galaktose, 1/5 dagegen zu Galaktitol reduziert.
Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei der Untersuchung der 64 - jährigen Schwester. Eine Aktivität der Galaktokinase in den Erythrozyten konnte bei keinem der beiden festgestellt werden. Enzymtests in der Familie der Patienten, deren Eltern übrigens verwandt waren, führten schließlich zu dem Schluß, daß es sich beim Galaktokinase - Defekt um eine Erkrankung handeln muß, die autosomal rezessiv vererbt wird.

Die Hypergalaktosämie und -urie als Symptome dieser Krankheit findet man auch in der Ver-

öffentlichung Thalhammers (34) aus dem Jahre 1968, in der er den ersten Fall eines während der Neugeborenenperiode entdeckten Galaktokinase - Defektes beschreibt.
In den ersten Tagen nach der Geburt zeigte dieses Kind keinerlei auffällige Symptomatik, bis schließlich ein an der Wiener Klinik durchgeführter "Screening - Test" den Hinweis auf eine Erkrankung erbrachte. Auch in diesem Fall fand man, ähnlich wie bei dem erwachsenen Patienten Gitzelmann's, erhöhte Werte von Galaktose im Blut und Urin, sowie eine vermehrte Ausscheidung reduzierender Substanzen, die allerdings nach Verabreichen einer Galaktose - armen Diät aus dem Urin verschwanden. Umschriebene Linsentrübungen wurden zwar festgestellt, doch unterschieden sich diese Beobachtungen nicht von denen, die man bei gesunden Säuglingen gemacht hatte. Bei Absetzen der Diät und Wiedereinführung der Ernährung mit Kuhmilch konnte man nach ca. 20 - stündiger Latenz ein erneutes Ansteigen der Galaktose - Konzentration in Blut und Urin nachweisen.

Mit einem von Guthrie (9) entwickelten Test war es also gelungen, bei einem scheinbar gesunden Neugeborenen, eine Hypergalaktosämie aufzudecken, während mit dem von Ng (22) beschriebenen Enzymtest nachgewiesen werden konnte, daß keine Kinaseaktivität in den Erythrozyten vorhanden war. Ein weiterer Screening - Test, dessen Vorzug in der Möglichkeit liegt,

bei Transferase - Defekt auch Homozygote zu erfassen, stammt von Beutler (2), der darüber hinaus 1971 eine Methode (3) zur Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität in Erythrozyten veröffentlichte. Die Grundlagen dafür lieferte Sherman (29), dessen Prinzip auch Mayes und Guthrie (19) verwandten, als sie bei Frequenzanalysen des Galaktokinase - Defektes feststellten, daß von etwa 46000 Personen eine diese Stoffwechselanomalie aufweist.
Daß eine Diagnosestellung nicht nur nach der Geburt durch Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität in Erythrozyten und Fibroblasten möglich ist, zeigten Ng et al. (23) mit der 1977 erschienen Arbeit. Unter Verwendung gezüchteter Zellen aus dem Fruchtwasser gelang ihnen der Nachweis des Enzymdefektes während einer Schwangerschaft.
Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre beschäftigten sich ferner mit der Optimierung von Versuchsbedingungen bei der Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität.
Ausgangsmaterial dafür waren neben fetaler Leber (32) und Erythrozyten (3,18), häufig Fibroblasten (4,18,19,23,33), selten Leukozyten (33) und Amnionzellen (23).
Der pH - Wert, bei dem sich die größte Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten nachweisen ließ, wurde von Tedesco und Mellman (33) mit 7,5, von Ng et al. (23) mit 7,6 und von Mayes und Guthrie (19), Chacko et al. (4) und Pickering (26) mit 7,8 angegeben. Für Amnionzellen

und Leukozyten waren pH - Werte von 7,6 (23) bzw. 7,5 (33) ermittelt worden.
Bei der Untersuchung der Michaelis - Menten - Kinetik (21) ergaben sich für die Galaktokinase beträchtliche Unterschiede. Chacko et al. (4) beschrieben 10 - fach höhere k_M - Werte für die Substrate Galaktose und ATP als Tedesco und Mellman (33).
Diese Autoren konnten darüber hinaus, ebenso wie Russell (28) bei der Uridyltransferase, eine Zunahme der spezifischen Aktivität der Kinase sowie des Proteingehaltes während des Fibroblastenwachstums nachweisen. Chacko (4) dagegen konnte trotz wiederholter Bebrütung der Zellen keine Veränderungen an der spezifischen Aktivität feststellen.
Krooth und Weinberg (14), die sich bereits 1961 mit Studien an Zellen von Galaktosämie - Patienten beschäftigten, veröffentlichten 1966 eine Arbeit (15), die den Einfluß verschiedener Nährmedien auf das Zellwachstum beschrieb. Neben der Beobachtung, daß Fibroblasten von Galaktosämie - Patienten nicht in der Lage sind, radioaktiv markierte Galaktose zu metabolisieren, stellten sie ferner eine Begünstigung des Wachstums der gleichen Zellen durch Glukosemedium fest.
Während Tedesco und Mellman (33) anhand ihrer 1969 durchgeführten Untersuchungen zu dem Ergebnis gelangten, daß das Galaktosemedium das Wachstum der Fibroblasten nicht beeinträchtigt, beschrieben Chacko et al. (4) eine deutliche

Hemmung.

Da trotz der Vielzahl interessanter, jedoch oft widersprüchlicher Untersuchungsergebnisse wenig über die Galaktokinase (besonders in Amnionzellen) bekannt ist, soll diese Arbeit dazu beitragen, neue Informationen über dieses Enzym zu erbringen.

Ausgehend von der Methode Beutler's (3), die allgemein Anwendung gefunden hat, wurde in unserem Labor (30, 31) ein modifizierter Test entwickelt, der die Bestimmung der Enzymaktivität sowohl in Fibroblasten und Amnionzellen als auch in Leukozyten erlaubt.
Diese drei Zellarten, von denen Amnionzellen und Fibroblasten im Brutschrank gezüchtet werden müssen, während bei den Leukozyten lediglich die Extraktion aus dem Vollblut notwendig ist, stellten das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dieser Arbeit dar.
Beginnend mit der Ermittlung des pH - Optimums für das Enzym Galaktokinase, sollte anschließend als dynamische Größe die Michaelis - Konstante, (k_M), (21) für die Substrate Galaktose und ATP bestimmt werden. Enzymtests, in regelmäßigen Anständen über mehrere Wochen an Zellen einer Person durchgeführt, sollten Aufschluß darüber erbringen, wie sich die Enzymaktivität während der Wachstumsphase der Zellen ändern würde. Bei diesem Versuch sollten Amnionzellen und Fibroblasten Verwendung finden, die sowohl von Nor-

malpersonen als auch von Patienten mit hetero- oder homozygotem Galaktokinase - Defekt stammen.
Ferner war beabsichtigt, zu klären, welchen Einfluß Galaktose auf die Entwicklung von Fibroblasten besitzt, wenn diese zunächst in Glukose - haltigem Nährmedium angezüchtet werden. Als Parameter für eine Beeinflussung des Zellwachstums sollte die Enzymaktivität bezogen auf die Proteinmenge bestimmt werden. Entsprechend dieser Versuchsdurchführung interessierte auch die Veränderung, die eventuell durch Glukose, bei zunächst mit Galaktose ernährten Zellen, auftreten könnten. Dies umso mehr, da man angesichts der biochemischen Gegebenheiten annehmen durfte, daß die Galaktose bei homozygoten Defektträgern wohl nicht verwertet werden könne, was zu einer Wachstumshemmung führen müsse.

M A T E R I A L

1. Zellkultivierung

Amnionzellen der Morphologie (10):

AF = amniotic fluid cell
(typische Zellen aus dem Fruchtwasser)
E = epitheloid cell
AF/E = Mischtyp

Fibroblasten

Die Zellen stammen von Patienten, bei denen in hetero- oder homozygoter Form ein Galaktokinase - Defekt oder eine klassische Galaktosämie nachgewiesen wurde, ferner von Probanden ohne einen der genannten Stoffwechseldefekte. Amnionzellen und Fibroblasten wurden im genetischen Labor der Kinderpoliklinik München,[x] Leiter: Prof. Dr. J. D. Murken, und im Labor der Sektion Cytogenetik der Universitätsfrauenklinik Ulm, Bereich Oberer Eselsberg, 79 Ulm, gezüchtet.

[x] An dieser Stelle möchte ich Frau Dr. Brigitte Haas und Frau Dr. Antje Wirtz für die gute Zusammenarbeit danken.

Inkubator mit 5 % CO_2 - Luftatmosphäre
Temperatur: 37°C

Falcon 3024 Tissue Culture Flask
1950 Williams Drive
Oxnard, California

TC - Medium HAM F 10, getrocknet, 500 ml
DIFCO Laboratories
Detroit

Indikator: Phenol Rot 0,2 %, 0,35 ml/ 100 ml Medium

Fetales Kälberserum, Virus u. Mycoplasma screened
GIBCO Laboratories

GIBCO Antibiotic - Antimycotic - Mixture
Penicillin 10000 U/ml
Fungizone 25 mcg/ml
Streptomycin 10000 mcg/ml
GIBCO Laboratories

BACTO - Trypsin
DIFCO Laboratories

$NaHCO_3$ - Lösung, 1 molar, 8,4 %, pH 7,0 - 7,2, steril
Fresenius KG
Bad Homburg

Glukoselösung 10 g/ 100 ml, steril
Fresenius KG
Bad Homburg

Galaktoselösung 10 g/ 100 ml, steril
Apotheke der Universität
München

2. Zellaufbereitung

Mercaptoäthanol 10 mM
Schuchardt
München

NaCl - Lösung, isoton
Fresenius KG
Bad Homburg

Dextran
Serva Feinbiochemica
Heidelberg

Essigsäure 0,1 %
Merck
Darmstadt

Trombophob (Heparin)
Nordmarck

3. Proteinbestimmung

$CuSO_4$ 5,5 g in 100 ml Aqua dest.
Merck
Darmstadt

Na_2CO_3 2 %, in 0,1 n NaOH
Merck
Darmstadt

Seignette - Salz 1,35 g in 100 ml Aqua dest.
Merck
Darmstadt

Folin - Ciocalteus - Phenolreagenz
Merck
Darmstadt

Albumin aus Rinderblut, 12018
Merck
Darmstadt

Eppendorf - Photometer mit rotempfindlichem Multiplyer, 772 nm

Mikroküvetten für Photometer

Mikroschlitz 1 x 4

4. Vorbereitung der ^{14}C - Galaktose

D - (1 - ^{14}C) - Galaktose, 60 mCi/ mmol
Amersham Buchler
Braunschweig

$MgCl_2$, 0,1 M
Merck
Darmstadt

Hexokinase (Boehringer Hefe 10 mg/ ml, 140 mU/ mg
1 : 50 in Aqua dest.)
Boehringer
Mannheim

ATP 120 mM
Merck
Darmstadt

Tris - HCl - Puffer, pH 8,0, 1 M
Merck
Darmstadt

5. Galaktokinase - Testansatz

D - (1 - ^{14}C) - Galaktose, 60 mCi/ mmol
Amersham Buchler
Braunschweig

Galaktose 10 mM
Boehringer
Mannheim

NaF 100 mM
Merck
Darmstadt

$MgCl_2$ 100 mM
Merck
Darmstadt

ATP 40 mM
Merck
Darmstadt

Tris - DTT - Puffer aus:
Trishydroxymethylaminamethan $C_4H_{11}NO_3$ 1 M
Merck
Darmstadt
und
Dithioerythrit $C_4H_{10}O_2S_2$ 0,1 M
Serva Feinbiochemica
Heidelberg

6. Säulenchromatographie

Einmalspritzen 2 ml mit Glasfibernetz

Servacel - DEAE - 23 SS p.A.,
Standardkapazität 0,55 - 0,75 mäq/ g,
Körnung 50 - 200 u
Volumen (feucht) 7,5 g/ml
Serva Feinbiochemica
Heidelberg

HCl 100 mM
Merck
Darmstadt

7. Radioaktivitätsmessung

Szintillationszähler:
Delta 300 Liquid Scintillation System
Modell 6890, Nuclear Chicago, Searle
Searle Analytic Inc.
2000 Nuclear Drive
Des Plaines, Illinois 60018

Liquid Scintillator KL 402, E. max. 415 nm
Koch - Light - Laboratories Ltd.
Colnbrook Bucks, England

Vial 20 ml
Zinsser
Heidelberg

METHODEN

1. Zellkultivierung

Die für die Versuche verwendeten Fibroblasten wurden zum Teil schon vor längerer Zeit verschiedenen Patienten mit Galaktokinase - Defekt oder klassischer Galaktosämie entnommen und im genetischen Labor der Kinderpoliklinik München und im Labor der Sektion Cytogenetik der Universitätsfrauenklinik Ulm gezüchtet.

Die Entnahme erfolgte aus der Ellenbeuge, wobei eine Procain - Quaddel gesetzt wurde. Das gewonnene, ca. 0,3 bis 0,5 cm^3 große Gewebsstück wurde zunächst zerkleinert und anschließend in einer Gewebekultur - Flasche unter einer perforierten Folie angesetzt.

Die Amnionzellen stammen aus Fruchtwasser, das im Rahmen der genetischen Beratung zur Chromosomenanalyse eingereicht wurde.
Das Fruchtwasser wurde zentrifugiert, die im Sediment vorgefundenen Zellen zusammen mit Nährmedium in einer Kulturflasche angesetzt.

Das verwendete TC - Medium HAM F 10 wird rehydriert und mit einem Indikator versetzt. Zu 100 ml Medium werden deshalb etwa 0,35 ml 0,2 % - iges Phenol Rot gegeben.

Die Zusammensetzung des Nährmediums ergibt sich folgendermaßen:

100 ml	TC - Medium HAM F 10 rehydriert einschließlich 0,2 % Phenol Rot	≙ ca.75,3%
30 ml	fetales Kälberserum	≙ ca.22,6%
1,8 ml	1 M $NaHCO_3$ - Lösung 8,4 %	≙ ca. 1,4%
1 ml	Antibiotic - Antimycotic - Mix.	≙ ca. 0,7%
	Penicillin 10000 U/ml	
	Fungizone 25 mcg/ml	
	Streptomycin 10000 mcg/ml	

Die 1 M 8,4 % - ige $NaHCO_3$ - Lösung dient der Einstellung des pH - Wertes auf ca. 7,0 bis 7,2.

Die mit Zellen und Nährmedium beschickten Kulturflaschen werden im Inkubator bei 37 °C und einer 5 % - igen CO_2 - Luftatmosphäre bebrütet, bis nach etwa 3 bis 14 Tagen, im Durchschnitt nach 11 Tagen, das Wachstum z. B. der Fibroblasten feststellbar ist.
Zur Überwachung des Wachstums werden die in den Flaschen angesetzten Zellverbände dreimal pro Woche durchgemustert. Das Nährmedium wird in der Regel alle 5 - 7 Tage ausgetauscht. Die Klassifizierung der Zelltypen erfolgt analog der Veröffentlichung von Hoehn et al. (10).

Haben sich die Zellen in der Mutterflasche genügend vermehrt, so werden sie mit 0,25 % - igem Bacto - Trypsin vom Flaschenboden gelöst, das Sediment wieder in die Flasche zurückgegeben

und nach weiteren 8 Tagen erneut trypsiniert. Die Zellen werden dann auf mehrere Flaschen verteilt, so daß diese ca. 1000 Zellen enthalten.

Für die Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer war es notwendig, für die große Zahl von Versuchen eine entsprechende Menge an Kulturflaschen zur Verfügung zu haben, die alle nur solche Zellen enthielten, die einer Mutterflasche entstammten. Nur so konnten jeweils im Abstand von 3 Tagen drei (bzw. zwei in Abb. 2) übereinstimmende Zellkulturen vergleichend für den Testansatz Verwendung finden.

Für die Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Nährmedium wurden ebenfalls identische Zellen benötigt, die in der gleichen, oben angegebenen Weise gezüchtet wurden.

Lediglich das Glukose - haltige Nährmedium wurde durch ein solches ersetzt, das 100 mg % Galaktose enthielt. Der Austausch des Mediums erfolgte bei dieser Versuchsanordnung alle 4 Tage, wobei je nach Anforderung Glukose - gegen Galaktose - haltiges Medium oder umgekehrt ausgewechselt wurde.

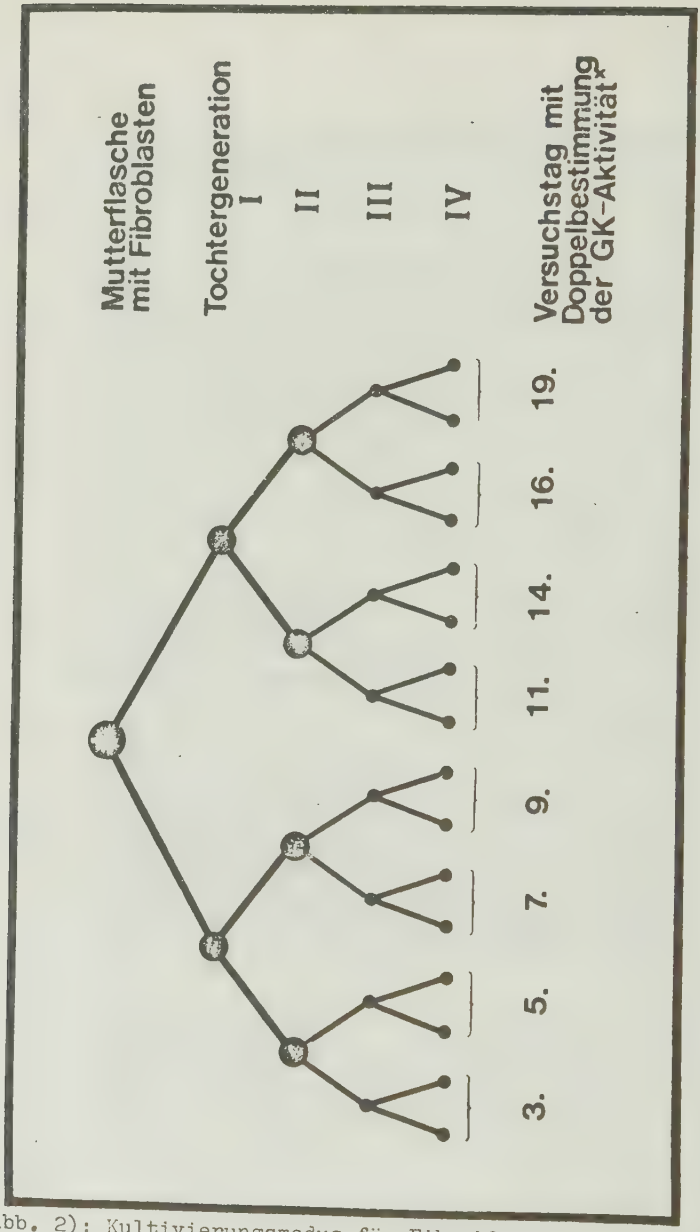

Abb. 2): Kultivierungsmodus für Fibroblasten
*(entsprechend dem in Abb. 5 b) dargestellten Versuch)

2. Präparation von Fibroblasten und Amnionzellen

Nach dem Transport der Zellen vom genetischen Institut in das Stoffwechsellabor werden diese auf einer Wärmeplatte bei 37 °C gelagert, um eine Schädigung durch Auskühlung zu verhindern. Das Medium, das der Ernährung der Zellen während des Aufenthalts im Brutschrank diente, wird aus den Kulturflaschen abgesaugt. Mit ca. 3 ml isotoner Kochsalzlösung wird das Gefäß nun gespült, um die nicht am Flaschenboden haftenden, toten Zellen durch Absaugen entfernen zu können. Diese abgestorbenen Zellen würden sonst bei der Proteinbestimmung miterfaßt werden, ohne daß sie noch eine Galaktokinase - Aktivität aufweisen.
Nach erneuter Zugabe von ca. 3 ml isotoner NaCl - Lösung werden die Zellen mittels einer gummiüberzogenen Drahtschlinge durch schabendes Hinundherbewegen von der Unterlage gelöst und zusammen mit der Flüssigkeit in ein Reagenzglas pipettiert. Dieser Vorgang wird nochmals wiederholt, um möglichst alle Zellen einer Kultur für die Enzym - und Proteinbestimmung zu erhalten. Anschließendes Schütteln soll die Auflösung größerer Zellverbände bewirken und die Zahl verbleibender, enzymatisch nicht aktiver Zellen noch weiter verringern.
Die Zellsuspension wird nun zweimal 15 Minuten lang bei 1500 Upm (≙ ca. 200 g) unter Zimmertemperatur zentrifugiert, wobei nach dem ersten Durchlauf der Überstand abgesaugt und das Rea-

genzglas erneut mit physiologischer NaCl - Lösung beschickt und geschüttelt wird.
Nach dem zweiten Durchlauf wird der Überstand ebenfalls verworfen, das Sediment nun aber mit einer der Erfordernissen des Versuchs angepaßten Menge an Aqua dest. bzw. 10 mM Mercaptoäthanol gelöst und geschüttelt.
Diese Zellsuspension wird in ein Eppendorf - Gefäß pipettiert und etwa 1 Minute zentrifugiert (Zimmertemperatur). Der Überstand kann in dieser Form für den Testansatz zur Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität verwendet werden. Für die Proteinbestimmung, die unter Punkt 4 der Methoden beschrieben ist, wird der restliche Überstand zusammen mit den sedimentierten Zellen eingefroren.

3. Leukozytenpräparation

Zur Trennung der Leukozyten von den übrigen Blutbestandteilen ist es notwendig, eine Lösung herzustellen, die sich aus 5 g Dextran, 0,7 g NaCl, 50 mg Heparin und 100 ml Aqua dest. zusammensetzt. 5 ml des einer Vene entnommenen, nicht geronnenen Blutes werden in ein Reagenzglas zu 1 ml der oben beschriebenen Lösung gegeben und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Die folgende Sedimentation soll bei Raumtemperatur erfolgen und eine Stunde dauern. Anschließend wird der Überstand, der neben Plasma noch Leukozyten enthält, vorsichtig abgehoben. 15 Minuten lang wird dann bei 1500 Upm (≙ ca. 200 g) zentrifugiert und der neu gewonnene Überstand, das Plasma, entfernt.

Das Sediment, das aus Leukozyten und Lymphozyten besteht und meist noch einige Erythrozyten enthält, wird mit 0,150 ml 0,1 % Essigsäure etwa 15 bis 30 Sekunden geschüttelt und sofort mit 5 ml 0,7 % NaCl aufgefüllt. Dieses Vorgehen dient der Zerstörung der Erythrozyten bei gleichzeitigem Schutz der Leukozyten. Erneut wird 15 Minuten lang bei 1500 Upm (≙ ca. 200 g) zentrifugiert. Befinden sich noch immer Erythrozyten im Sediment, was an der rötlichen Verfärbung erkennbar ist, so muß die Essigsäure - und NaCl - Zugabe wiederholt werden. Andernfalls wird das Sediment in 1,5 ml Aqua dest. suspendiert und somit für die Galaktokinase - Bestimmung verwendbar gemacht.

4. Proteinbestimmung

Das in den Zellen vorhandene Protein wird nach einer Methode bestimmt, die Oliver H. Lowry (17) im Jahre 1951 angegeben hat, und die in unserem Labor modifiziert wurde.
Die Proben werden zu diesem Zweck aufgetaut und zentrifugiert. Dann entnimmt man den Überstand, pipettiert in ein neues Gefäß und verwirft die Zellen. Somit ist gewährleistet, daß der Überstand für spätere eventuell erforderliche Wiederholungsbestimmungen nicht durch weiteren Austritt von Protein aus den Zellen in seinem Proteingehalt verändert wird.
Vom Überstand werden 0,02 ml für die Proteinbestimmung entnommen und ebenso wie 0,2 ml Kupferreagenz in ein Eppendorf - Gefäß pipettiert. Dieses Kupferreagenz setzt sich zusammen aus 5 ml in 0,1 n NaOH gelöstem 2 % - igem Na_2CO_3 und 0,1 ml eines Gemisches aus 0,1 ml $CuSO_4$, von dem 5,5 g in 100 ml Aqua dest. gelöst wird, sowie 0,01 ml Seignettesalz, und zwar 1,35 g in 100 ml Aqua dest..
Nach Zugabe des Kupferreagenz zum Überstand läßt man das Gefäß 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen, um dann 0,02 ml Folin - Ciocalteus - Reagenz, das 1:1 mit 2 % - igem Na_2CO_3 verdünnt wird, hinzuzufügen.
Nach weiteren 30 bis 35 Minuten, während der die Proben in Dunkelheit stehen sollen, werden 0,2 ml in eine Mikroküvette pipettiert und die Extinktion an einem Photometer mit rotempfind-

lichem Multiplyer bei 772 nm abgelesen.
Für die Bestimmung des Proteinwertes aus der Extinktion ist eine Standardkurve notwendig, d. h. eine Kurve, die sich nach Auftragen der Extinktion gegen die Proteinkonzentration in einem Diagramm aus der Verbindung der Extinktionswerte ergibt.
Als Standard wird Rinderserumalbumin verwendet, das in den Konzentrationen von 0,025, 0,05, 0,1, 0,25 und 0,5 mg/ ml statt des Überstandes Verwendung findet.
Den Leerwert erhält man, wenn bei einem sonst gleich behandelten Ansatz der Überstand durch Wasser ersetzt wird.
Aus der dadurch erhaltenen Standardkurve kann man durch Eintragen der Extinktion der jeweiligen Probe die entsprechende Proteinkonzentration entnehmen.

5. Vorbereitung der ^{14}C - Galaktose

Die von Amersham Buchler, Braunschweig, gelieferte D - (1 - ^{14}C) - Galaktose, 60 mCi/ mmol, wird vor der Verwendung im Galaktokinase - Test einer Behandlung mit Hexokinase unterzogen, da sich gezeigt hat, daß gelegentlich geringe Mengen von ^{14}C - Glukose enthalten waren.
Die radioaktiv markierte Glukose wird nämlich in den Zellen ebenfalls phosphoryliert und liegt dann als ^{14}C - Glukose - 6 - Phosphat vor. Da sich dieses Produkt aber ähnlich wie Galaktose - 1 - Phosphat verhält und somit die Auswertung der Galaktokinase - Reaktion stört, muß es mittels Hexokinase - Behandlung entfernt werden.
Zu 1 ml ^{14}C - Galaktose gibt man 0,005 ml 0,1 M $MgCl_2$, 0,1 ml Hexokinase (Boehringer Hefe 10 mg/ ml, 140mU/ mg, 1:50 in Aqua dest,), sowie 0,005 ml 120 mM ATP und 0,005 ml 1 M Tris - HCl - Puffer mit pH 8,0. Dieses Gemisch wird bei 37 °C 60 Minuten lang inkubiert und anschließend auf eine DEAE - Cellulose - Säule (Volumen 0,5 ml, OH^- - Form, pH 7,0) gegeben. Gewaschen wird mit 5 ml Aqua dest. und man erhält im Eluat ^{14}C - Galaktose, die mit Scintillationsflüssigkeit gemischt im Scintillationszähler ausgewertet wird.
Spült man die Säule erneut, diesmal aber mit 5 ml 100 mM HCl - Puffer, so erhält man ^{14}C - Glukose - 6 - Phosphat. In der Regel fanden sich davon zwischen 2 und 5 %.

6. Galaktokinase - Testansatz

Entsprechend der von Beutler (3) erstmals beschriebenen und in unserem Labor modifizierten Methode (30,31) werden für den Testansatz 0,05 ml des Überstandes, der durch Zugabe von 0,5 ml 10 mM Mercaptoäthanol zu dem gewaschenen Zellsediment und anschließendes Zentrifugieren gewonnen wird, in ein Eppendorf - Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von 0,05 ml des 1 M Tris - DTT - Puffers mit definiertem pH - Wert wird geschüttelt und 10 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise wird durch die Epimerase UDP - Glukose in UDP - Galaktose überführt, das NADH in NAD^+ umgewandelt und so eine optimale Bedingung für die enzymatische Reaktion geschaffen.
Den Tris - DTT - Puffer erhält man aus 10 ml 2 M Tris und 2 ml 1 M Dithioerythrit, wobei dieses Gemisch dann mittels HCl auf einen definierten pH - Wert eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt wird, so daß ein 1 M Puffer entsteht.
Im Anschluß an die Vorinkubation werden zu den 0,1 ml Überstand - Puffer - Gemisch 0,1 ml Reaktionsgemisch gegeben, das Gefäß geschüttelt und erneut bei 37 °C inkubiert, diesmal aber 60 Minuten lang.

Das Reaktionsgemisch setzt sich zusammen aus:

1 Teil	^{14}C - Galaktose	10uCi/ml	(0,1uCi/ml)
1 Teil	Galaktose	10 mM	(1 mM)
2 Teile	NaF	100 mM	(10 mM)
2 Teile	$MgCl_2$	100 mM	(10 mM)
2 Teile	ATP	40 mM	(4 mM)

(Die in Klammern angegebenen Werte stellen die Endkonzentrationen der einzelnen Substanzen in dem Reaktionsgemisch von 0,1 ml dar.)

Nach Zugabe des Reaktionsgemisches verläuft die Reaktion folgendermaßen:
Galaktose und ATP werden durch das in den Zellen vorhandene Enzym Galaktokinase in Galaktose - 1 - Phosphat und ADP überführt.

Die Reaktion wird nach 1 Stunde beendet, indem man durch einen 3 Minuten dauernden Kochstop, d. h. Erhitzen des Gefäßinhalts auf 95 °C, das Enzym denaturiert und ihm so seine enzymatische Eigenschaft nimmt.
Bis zur Trennung des radioaktiven Produktes ^{14}C - Galaktose - 1 - Phosphat von dem Substrat Galaktose mittels Säulenchromatographie werden die Proben im Kühlschrank gelagert.
Für die Berechnung der Enzymaktivität wird auch ein Leerwert benötigt, den man erhält, wenn man die Zellsuspension durch Aqua dest. ersetzt, die Probe sonst aber wie die anderen behandelt.

7. Präparation der Diäthylaminoäthyl - Cellulose

Ein Teil des Servacel - DEAE - Cellulose - Pulvers, bestehend aus vernetzten Fasern mit einer Standardkapazität von 0,55 bis 0,75 mäq/ g, einer Körnung von 50 bis 200 u und einem Volumen von 7,5 g/ ml im feuchten Zustand, wird mit zwei Teilen destillierten Wassers suspendiert. Durch die anschließende Sedimentation soll eine Trennung von Grob- und Feinkorn erzielt werden, so daß die feinen, langsamer absinkenden Partikel durch Absaugen oder Dekantieren entfernt werden können.
Das Sediment wird mit Aqua dest. erneut suspendiert, der Sedimentation überlassen und der Überstand abgesaugt und verworfen.
Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, um die Cellulose ausreichend zu waschen.
Dann gibt man die dem anfänglichen Wasservolumen entsprechende Menge an 1 n NaOH auf das Sediment und rührt ca. eine Stunde. Schließlich läßt man die Suspension erneut sedimentieren und wäscht in der oben angegebenen Weise das Sediment etwa dreimal mit dest. Wasser, bis mit Indikatorpapier ein pH - Wert von ca. 9 nachgewiesen werden kann.
Die DEAE - Cellulose in ihrer OH^- - Form kann nun für die Trennung der einzelnen Fraktionen verwendet werden.

8. Säulenchromatographie, Radioaktivitätsmessung und Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität

Zur Trennung von Galaktose -1 - Phosphat und Galaktose werden Säulen mit DEAE - Cellulose beschickt. Bei den Säulen handelt es sich um 2 ml - Einmal - Spritzen, deren Kolben entfernt werden. Die Kanülenöffnung wird von innen her durch ein Netz aus Glasfasergewebe bedeckt, um das Ausfließen der DEAE - Cellulose zu verhindern. Die Säulen werden dann so fixiert, daß die Kanülenöffnung nach unten in ein ca. 20 ml fassendes Kunststoffgefäß (Vial) reicht, in dem die einzelnen Fraktionen gesammelt werden. Nun wird angewärmte DEAE - Cellulose in OH^- - Form mittels Pasteur - Pipetten eingefüllt, so daß nach Abtropfen des wässrigen Bestandteils der Cellulose 0,8 ml der Festsubstanz zurückbleiben.
Die im Kühlschrank gelagerten Proben werden aufgetaut, kurz zentrifugiert, um das ganze Volumen zu erhalten, dann werden 0,15 ml entnommen und auf die Cellulose gegeben. Die erste Fraktion wird durch Zugabe von 1 ml Aqua dest. gewonnen, für die zweite werden 2 ml und für die dritte 3 ml Aqua dest. auf die Säule gegeben und in getrennten Auffanggefäßen gesammelt.
In den ersten drei Fraktionen erscheint die Galaktose, die durch die Galaktokinase nicht umgesetzt wurde. Die phosphorylierte Galaktose, also Galaktose - 1 - Phosphat, bleibt bei Zu-

gabe von Aqua dest. wegen der durch den Phosphatrest bedingten Negativität weiter an die Cellulose gebunden. Galaktose - 1 - Phosphat wird schließlich in den Fraktionen 4 und 5 durch Zufügen von je 1,5 ml 100 mM HCl ausgewaschen. Die Gefäße aller Fraktionen werden mit mindestens 12,5 ml Scintillationsflüssigkeit, immer aber soviel, daß die Lösung klar wird, beschickt und geschüttelt.
Der Counter liefert dann Aufschluß über die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen und damit über die Umsetzung von ^{14}C - Galaktose zu ^{14}C - Galaktose - 1 - Phosphat durch die Galaktokinase.
Für die Berechnung der Enzymaktivität wird die Summe der Counts der Fraktionen 4 und 5 zu der der Fraktionen 1 bis 5 ins Verhältnis gesetzt. Die Ermittlung eines 100 % - Wertes erleichtert dabei die rechnerische Auswertung. Zu diesem Zweck werden einem Gemisch aus den Resten der nicht auf die Säulen gegebenen Proben 0,15 ml entnommen, also die gleiche Menge, die zur Trennung mittels Säule verwendet wird. Dann fügt man 1,35 ml 100 mM HCL und 12,5 ml Scintillationsflüssigkeit hinzu.
Die 0,15 ml Gemisch enthalten die den 5 Fraktionen entsprechende Menge an Radioaktivität, also 100 %, somit können die Counts der Fraktionen 4 und 5 auch zu den Counts, die der 100 % - Wert liefert, ins Verhältnis gesetzt werden. Der so gewonnene Wert wird noch durch die Proteinmenge dividiert und mit einem Verdünnungsfaktor multipliziert.

E R G E B N I S S E

1. pH - Optimum

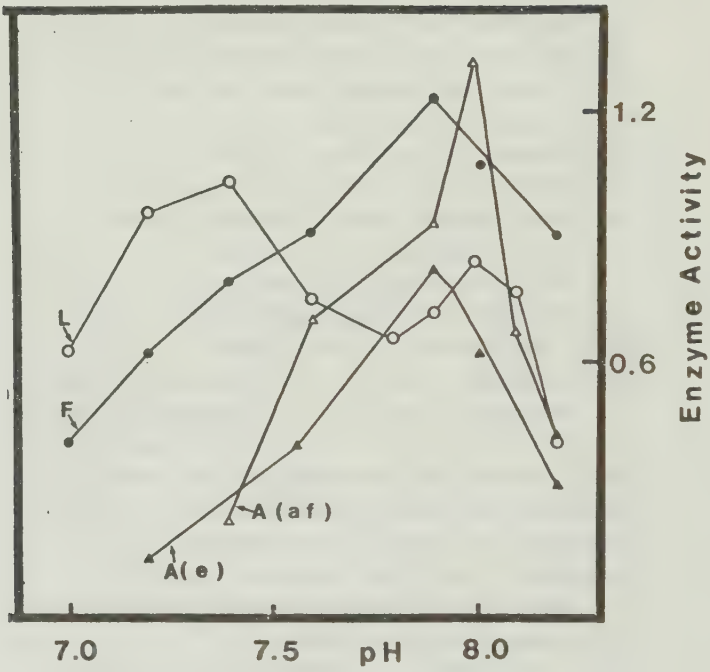

Abb. 3: Einfluß des pH - Wertes auf die Galaktokinase - Aktivität in menschlichen Fibroblasten (F), Leukozyten (L) und Amnionzellen (A) vom epitheloiden (e) und amniotic fluid (af) Typ.

Zur Bestimmung des pH - Optimums der Galaktokinase wurden Fibroblasten und Amnionzellen in der unter Methoden beschriebenen Weise im Brutschrank gezüchtet, während die Leukozyten durch Extraktion aus venösem Vollblut gewonnen werden konnten. Für den Testansatz fanden neun verschiedene Tris - DTT - Puffer Verwendung, die folgende pH - Werte aufwiesen: 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2.

Die Auswertung der Enzymaktivität (Abb. 3)ergab für Fibroblasten ein Optimum bei pH 7,9, während für Amnionzellen zunächst kein einheitliches Ergebnis gefunden werden konnte. Erst durch wiederholte Untersuchungen gelang es, zwei Kurven zu verifizieren, die eine Zuordnung zu bestimmten morphologischen Unterschieden der Zellen erlaubte.
So zeigten die Amnionzellen mit epitheloider (e) Form ein pH - Optimum bei 7,9, die typischen Amnionzellen (af) dagegen ein Optimum bei pH 8,0.
Für die Galaktokinase - Aktivität in Leukozyten ergaben sich zwei Optima, eines bei pH 7,4, das andere bei pH 8,0 mit einer Enzymaktivität, die etwa um 20 % geringer war.

2. Michaelis - Konstante (k_M)

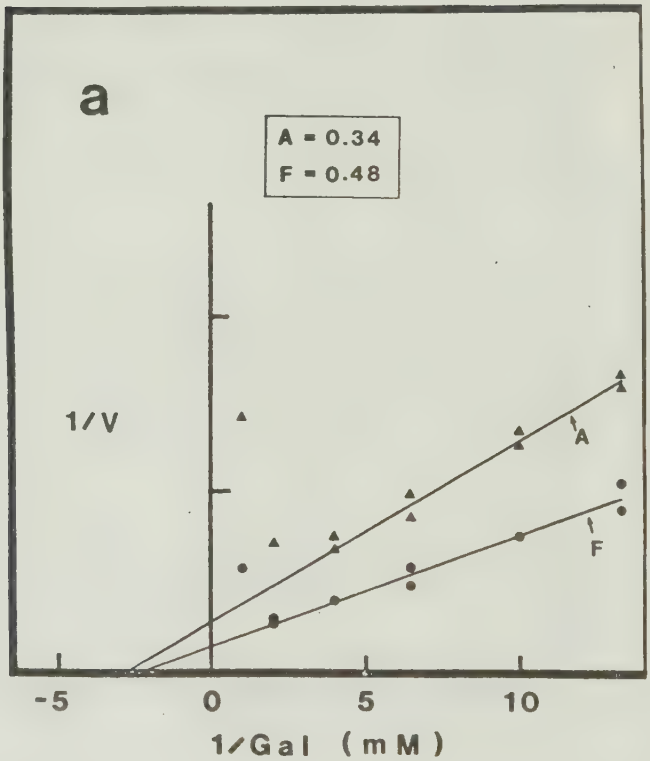

Abb. 4 a: k_M der Galaktokinase für Galaktose in Fibroblasten (●)(F) und Amnionzellen (▲)(A). ATP 4 mM.

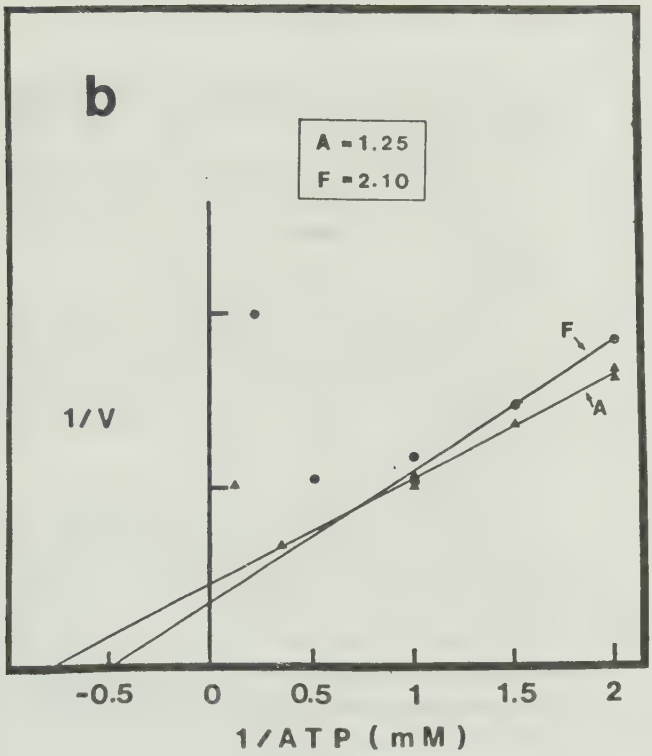

Abb. 4 b: k_M der Galaktokinase für ATP in Fibroblasten (●)(F) und Amnionzellen (▲)(A). Galaktose 10 mM.

Die Michaelis - Konstante (k_M) stellt eine Dissoziationskonstante dar, die der Substratkon-

zentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, entspricht. Der k_M - Wert, in Mol/ l angegeben, ist nicht nur von Enzym zu Enzym unterschiedlich, sondern auch bei einem bestimmten Enzym von Substrat zu Substrat.
Lineweaver und Burk (16) fanden 1934 ein Verfahren, das durch reziprokes Auftragen von Geschwindigkeit und Substratkonzentration eine graphische Bestimmung der Michaelis - Konstante, wie dies in Abb. 4 a und b gezeigt ist, erlaubt.
Uzr Ermittlung von k_M, wobei Galaktose (Abb 4a) als Substrat der Galaktokinase diente, wurden folgende Konzentrationen an unmarkierter Galaktose im Reaktionsgemisch (siehe Galaktokinase - Testansatz) verwendet:
1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 100 mM.
In entsprechender Weise wurden zur Bestimmung des ATP - abhängigen k_M - Wertes für die Galaktokinase die unten angeführten ATP - Konzentrationen in das Reaktionsgemisch eingesetzt:
2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 80 mM, 160 mM.
Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:
In Fibroblasten lag k_M für Galaktose bei 0,48 mMol/ l, für ATP bei 2,1 mMol/ l, während in Amnionzellen k_M 0,34 mMol/ l bzw. 1,25 mMol/l betrug.

3. Wachstumsabhängigkeit der Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten und Amnionzellen

Zum Nachweis der Abhängigkeit der Galaktokinase - Aktivität vom Wachstum der Zellen, war es notwendig, zahlreiche Kulturen zur Verfügung zu haben, wobei diese alle von ein und derselben Mutterflasche abstammen mußten.
Zu diesem Zweck wurde eine ausreichend mit Nährmedium versehene Kulturflasche solange im Brutschrank aufbewahrt, bis sich die Amnionzellen bzw. Fibroblasten soweit vermehrt hatten, daß sie auf zwei Flaschen verteilt werden konnten, wie dies unter Punkt 1 der Methoden erläutert wurde. In gleicher Weise verfuhr man dann mit diesen Flaschen, bis schließlich 18 bzw. 16 gleiche Zellkulturen vorhanden waren und so am 2., 4,, 7., 9., 11., 14., 16., 18., und 21. Tag bzw. in der aus Abb. 5 b und 6 b hervorgehenden Folge jeweils zwei davon, wegen der Doppelbestimmung, für die Aktivitätsmessung verwendet werden konnten.
Eine höhere Enzymaktivität kommt auch in einem vermehrten Umsatz von radioaktiv - markierter Galaktose zum Ausdruck, d.h. nach der Trennung mittels DEAE - Cellulose - Säule findet man eine größere Anzahl von ^{14}C - Gal - 1 - P im Eluat. Dadurch werden auch mehr Impulse gezählt, die dann in den Counts per minute (cpm) ihren Niederschlag finden.
Logarithmisch aufgetragen, zeigen in Abb. 5 a sowohl die cpm als auch die Proteinmenge eine

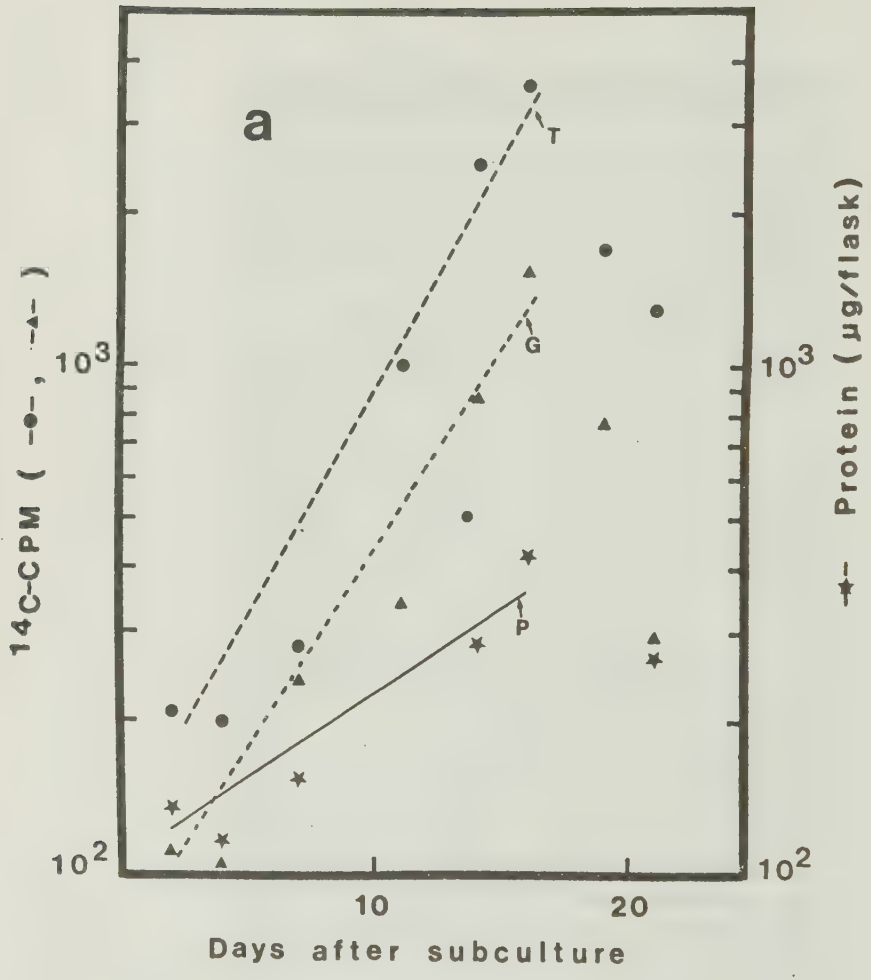

Abb. 5 a: ^{14}C - cpm, als Parameter für die Galaktokinase - Aktivität, sowie die Proteinmenge in Amnionzellen während des Wachstums. (logarithmischer Maßstab). Galaktokinase (▲)(G), Transferase (●)(T), Protein (★)(P)

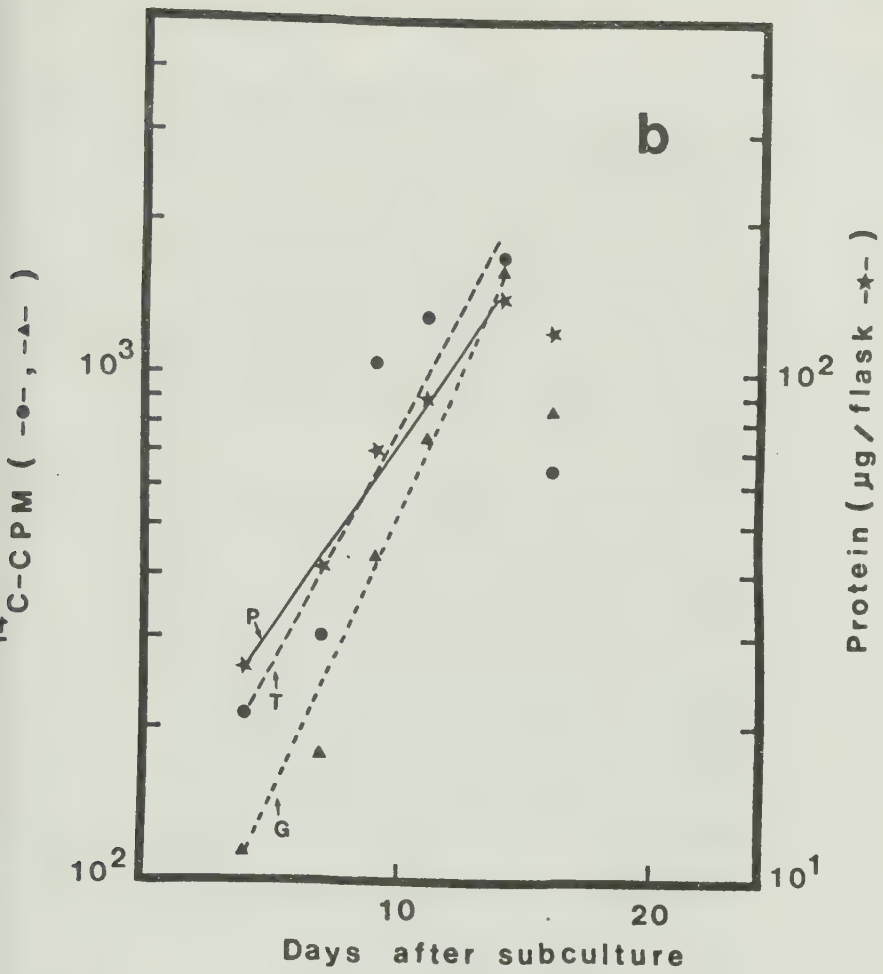

Abb. 5 b: ^{14}C - cpm, als Parameter für die Galaktokinase - Aktivität, sowie die Proteinmenge in Fibroblasten während des Wachstums. (logarithmischer Maßstab). Galaktokinase (▲)(G), Transferase (●)(T), Protein (★)(P)

lineare Zunahme über den Zeitraum der Kultivierung. Da jedoch die Steigung der Proteinkurve nur etwa halb so groß ist, wie die der cpm - Kurve, liegt der Schluß nahe, daß die Galaktokinase - Aktivität in Amnionzellen während des Wachstums doppelt so schnell zunimmt, wie die Proteinmenge. Somit nimmt auch die spezifische, d.h. die auf mg Protein bezogene Aktivität zu, wie dies auch aus der Abb. 6 a hervorgeht. Diese Aussagen gelten jedoch nur für die ersten 15 Tage etwa, bis die Plateauphase auftritt.
Etwas anders liegen dagegen die Verhältnisse in Abb. 5 b. Da die Proteinmenge um eine 10er Potenz niedriger ist, folgt daraus, daß die spezifische Aktivität der Galaktokinase in Fibroblasten etwa doppelt so hoch sein muß, wie in Amnionzellen. Auch hier verläuft die Steigung der cpm - Kurve steiler als die der Proteinkurve. Somit geht auch das Wachstum der Fibroblasten mit einer Zunahme der Galaktokinase - Aktivität einher. (siehe auch Abb. 6 b) Auch hier gilt die Aussage nur für den Zeitraum bis zum Einsetzen der Plateauphase.

Die folgenden Abbildungen 6 a und 6 b verdeutlichen noch einmal die Zunahme der Galaktokinase - Aktivität während des Wachstums der Amnionzellen bzw. der Fibroblasten.
Wie aus Abb. 6 a zu ersehen ist, nimmt die in mMol/min/mg Protein angegebene Galaktokinase - Aktivität in Amnionzellen vom 2. Tag

an ständig zu, um dann etwa zwischen dem 14. und 16. Tag bei einem ca. 4 - fach höheren Wert auf ein kurzes Plateau einzuschwenken.

Dieses Plateau wird bedingt durch den relativen Verbrauch an Nährmedium, der das Wachstum zum Stillstand kommen läßt. Da die Zellzahl ständig zunimmt, die Menge des Mediums, das etwa alle 3 Tage erneuert wird, aber gleich bleibt, kommt es zu einer Minderversorgung der Zellpopulation. in den folgenden Tagen nimmt die Enzymaktivität wegen der zunehmenden Schädigung der Zellen wieder ab, bis etwa am 21. Tag der Ausgangswert annähernd erreicht wird.

Ähnliche Verhältnisse werden auch bei den Fibroblasten (Abb. 6 b) deutlich, die, wie bereits erwähnt, eine gegenüber den Amnionzellen doppelt so hohe spezifische Aktivität aufweisen. Hierbei ist ebenso eine 4 - fache Aktivitätszunahme feststellbar, diese jedoch bereits um den 11. Tag. Dem steileren Anstieg folgt aber auch hier, nach einer kurzen Plateauphase, ein entsprechender, ebenso steiler Abfall bis etwa in Höhe des Ausgangswertes.

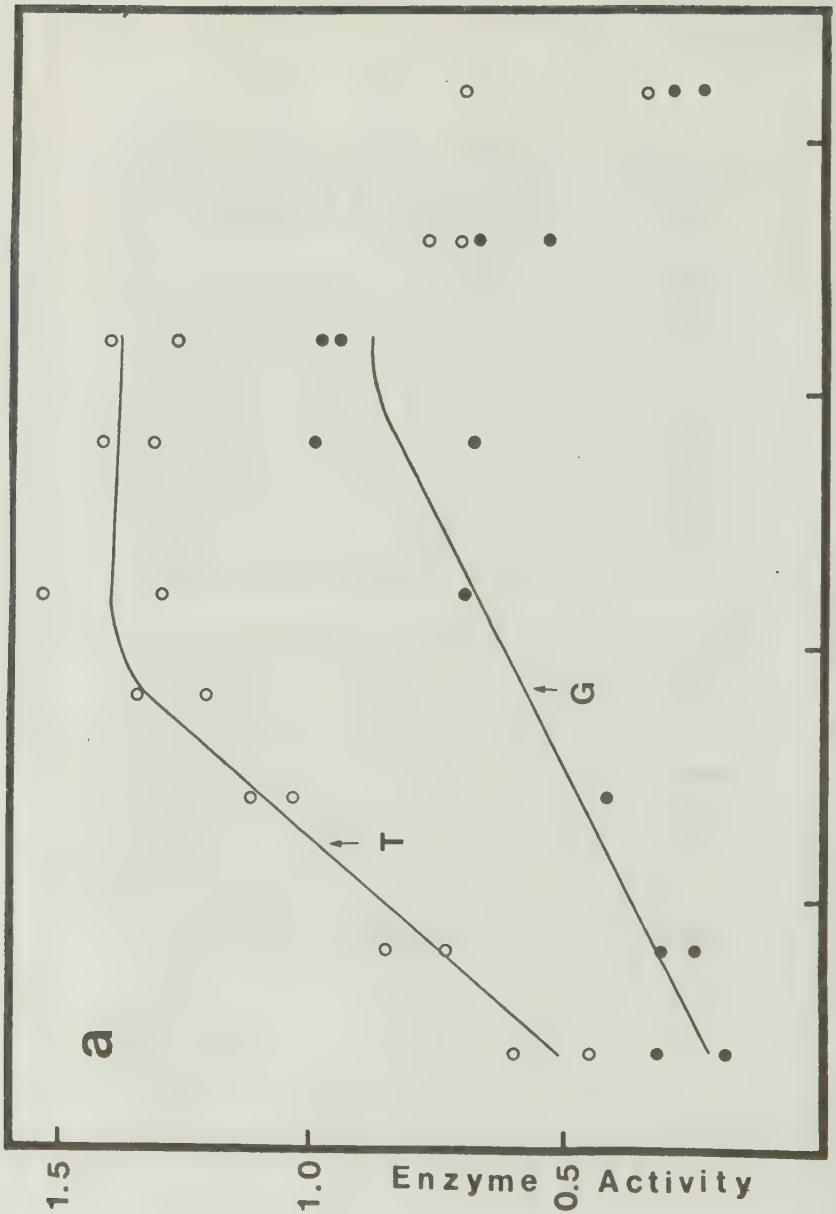

Abb. 6 a: Spezifische Galaktokinase - Aktivität in Amnionzellen während des Wachstums Galaktokinase (●)(G), Transferase (○)(T)

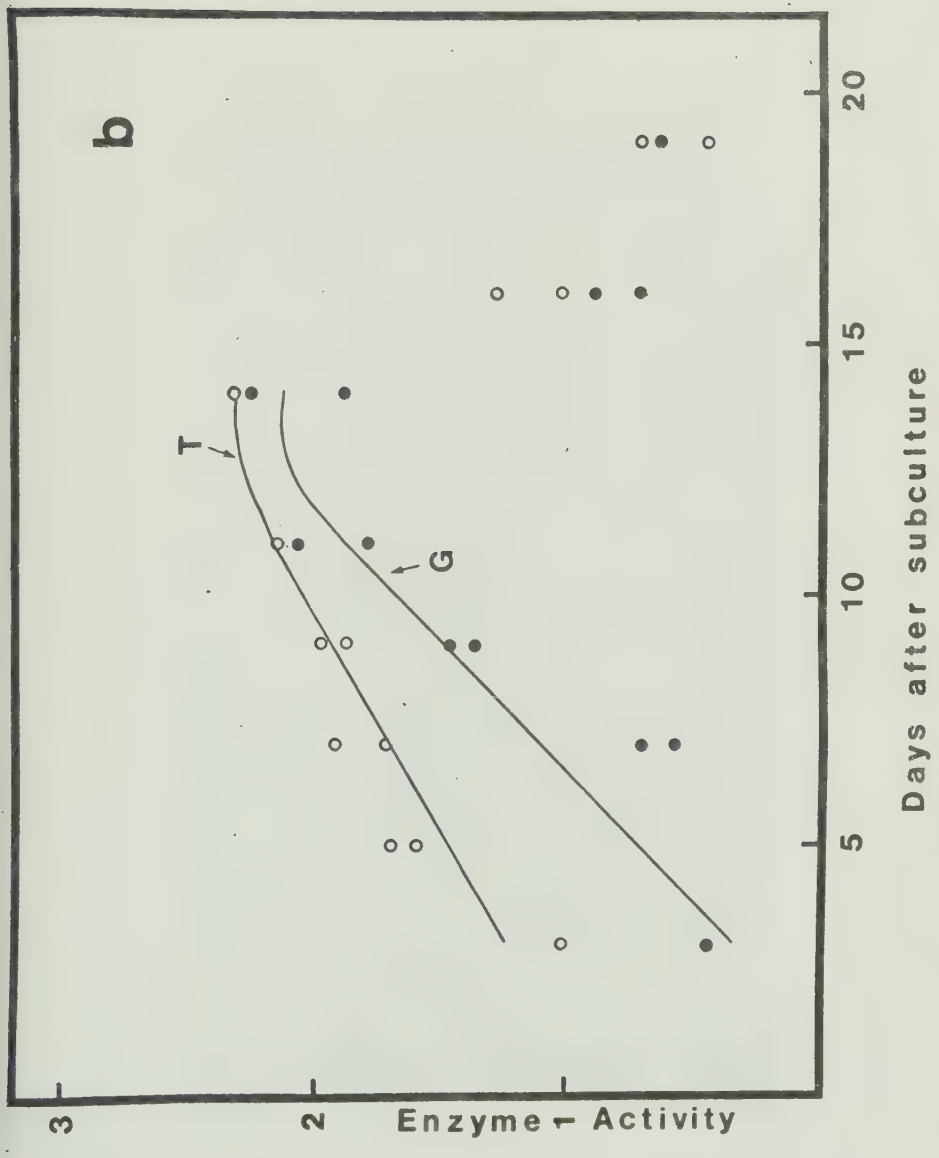

Abb. 6 b: Spezifische Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten während des Wachstums
Galaktokinase (●)(G), Transferase (o)(T)

4. Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten

Die im ersten Teil des Versuchs zum Nachweis des Einflusses verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität verwendeten Fibroblasten stammen von den Mitgliedern einer Familie.
O.J. weist keinen Defekt auf, O.R. und O.S. sind beide heterozygote Galaktokinase - Defekt - Träger, während O.N. homozygot ist und wie die Abb. 7 c und 7 d zeigen, keine Galaktokinase - Aktivität aufweist.
Für den zweiten Teil des Versuchs, der der Überprüfung der Ergebnisse dienen sollte, wurden ebenfalls Fibroblasten verwendet, die aber von Patienten mit Galaktosämie stammten.
K.M. ist heterozygot für die klassische Galaktosämie, W.A. heterozygoter Träger der Duarte Variante der Galaktosämie. Der Patient W.C. weist beide Defektausprägungen in heterozygoter Form auf, d.h. er ist heterozygot sowohl für die Duarte Variante als auch für die klassische Galaktosämie. Dieser Befund läßt sich nur durch die elektrophoretische Auftrennung des Enzyms erheben, da dieses keine einheitliche Molekularstruktur besitzt. Dies geht aus Untersuchungen von Mathei und Beutler (18) hervor, die durch die Aktivitätsbestimmung der Galaktose -1 - Phosphat - Uridyltransferase zunächst keine eindeutige Lösung gefunden hatten.

Die Fibroblasten wurden in der unter Punkt 1 der Methoden beschriebenen Weise gezüchtet, bis genügend Kulturflaschen mit identischen Tochtergenerationen zur Verfügung standen. (siehe Abb. 2).
Für die Versuche, die in den Abbildungen 7 a, 7 c, 8 a und 8 c dargestellt sind, enthielt das Medium, in dem die Zellkulturen jeder Person gezüchtet wurde, 100 mg Glukose pro 100 ml.

Die Ergebnisse der Abbildungen 7 b, 7 d, 8 b und 8 d stammen von Versuchen, bei denen statt Glukose Galaktose gleicher Konzentration im Medium verwendet wurde.
Am 4. Versuchstag erfolgte anhand von 3 der insgesamt 9 Kulturflaschen pro Person und Medium die Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität.
Am gleichen Tag erhielten die restlichen 6, der z. B. mit Glukose gezüchteten Kulturen einer Person, frisches Medium, wobei 3 Flaschen mit 100 mg Glukose/ 100 ml und weitere 3 mit 100 mg Galaktose/ 100 ml beschickt wurden. In gleicher Weise wurde mit den in Galaktose gezüchteten Zellen verfahren.
In diesen so behandelten Zellkulturen wurde dann am 8. Tag des Versuchs die Galaktokinase - Aktivität bestimmt.
Bei dem in Abb. 7 a dargestellten Versuch wurden Zellkulturen von Personen mit Galaktokinase - Defekt während der ersten vier Versuchstage in einem Medium, das 100 mg Glukose/ 100 ml

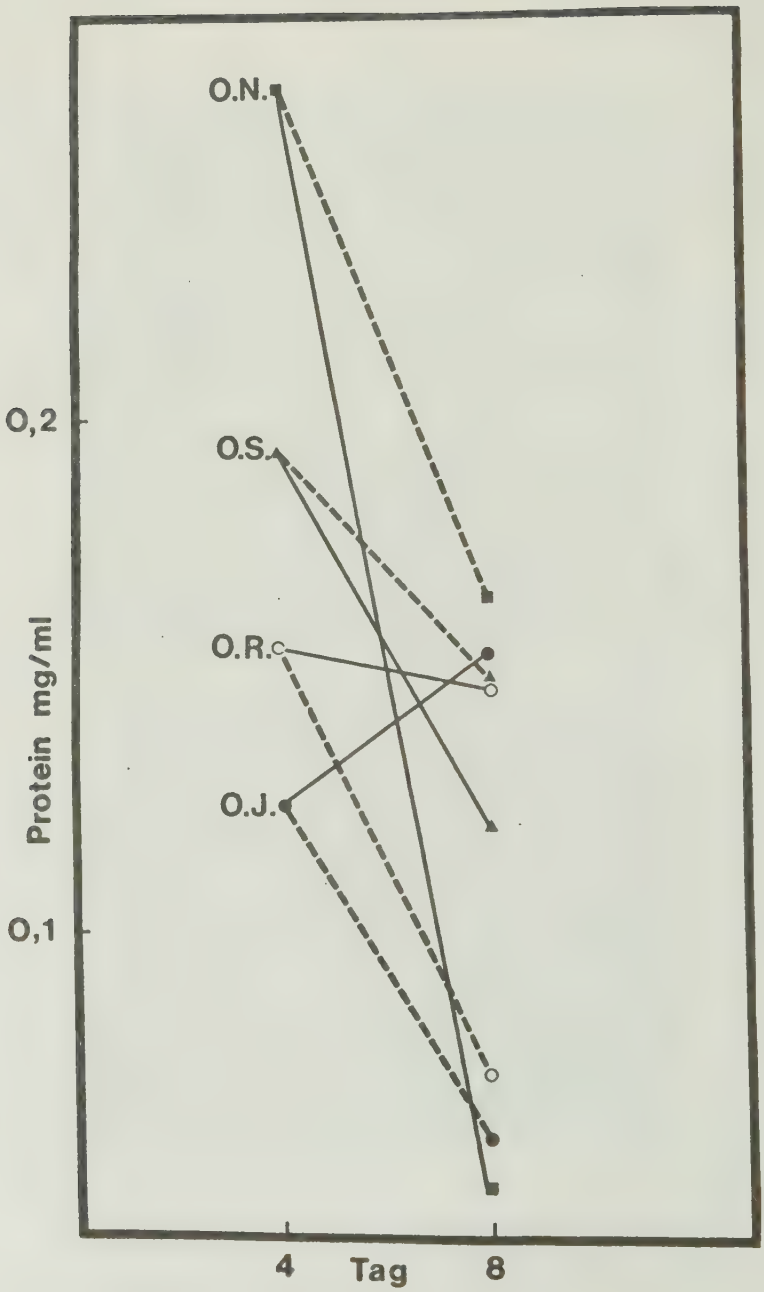

Abb. 7 a: Erläuterung siehe Seite 47

Abb. 7 a: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Proteinmenge von Fibroblasten.
O.J.: (●) gesunder Proband
O.R.: (○) heterozygoter GK - Defektträger
O.S.: (▲) " " "
O.N.: (■) homozygoter GK - Defektträger
Nährmedium:
bis 4. Tag: 100 mg Glukose/ 100 ml
ab 4. Tag: 100 mg Glukose/ 100 ml (——)
bzw. 100 mg Galaktose / 100 ml (- - -)

enthielt, gezüchtet.
Die ermittelten Proteinwerte am 4. Tag entsprechen in etwa den während des Fibroblastenwachstums üblichen Werten. Aufgrund einer nicht standardisierten Verteilung der Zellen auf die einzelnen Kulturflaschen kommt den absoluten Proteinwerten des 4. Tages weniger Bedeutung zu, als den Medien - abhängigen, eine bestimmte Tendenz der Beeinflussung zum Ausdruck bringenden Werten des 8. Tages.
Hierbei zeigt sich, daß die bis zum 4. Tag mit Glukose ernährten Zellen des Patienten O.N. nach weiteren 4 Tagen mit Glukose ein verringertes Wachstum aufweisen, als dies mit Galaktose der Fall ist. Gleiches gilt auch für den bezüglich des Galaktokinase - Defektes heterozygoten O.S., während die Fibroblasten des ebenfalls heterozygoten O.R. und die, des gesunden

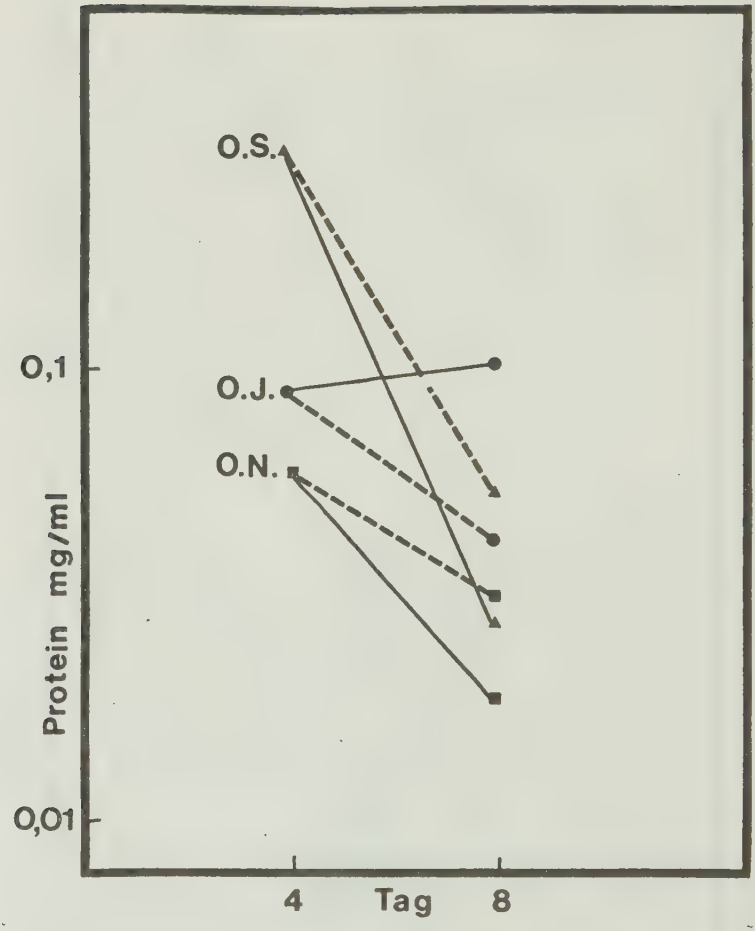

Abb. 7 b: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Proteinmenge von Fibroblasten.
Probanden: siehe Abb. 7 a
bis 4. Tag: 100 mg Galaktose/ 100 ml
ab 4. Tag: 100 mg Galaktose/ 100 ml (- - -)
bzw. 100 mg Glukose/ 100 ml (——)

O.J., mit Glukose offensichtlich besser wachsen.

Entsprechende Ergebnisse finden sich auch bei den mit Galaktose bis zum 4. Tag ernährten Zellen der Angehörigen dieser Familie (siehe Abb. 7 b).
Ausgehend von allgemein niedrigeren Werten am 4. Tag zeigen auch hier die den Defekt aufweisenden Zellen, daß Galaktose einen günstigeren Einfluß besitzt als Glukose. Diese Tendenz wird dennoch deutlich, wenngleich alle Proteinwerte am 8. Tag beträchtlich vermindert waren. Allein die Fibroblasten des gesunden Probanden O.J. weisen eine günstigere Entwicklung unter Glukose - Einfluß auf.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß unabhängig vom Anfangsmedium (Glukose bzw. Galaktose) in Zellen homo- und heterozygoter Galaktokinase - Defektträger nach dem Wechsel des Mediums höhere Proteinwerte unter dem Einfluß von Galaktosemedium gefunden wurden, als dies bei Glukose - ernährten Fibroblasten am 8. Tag der Fall war. Eine günstigere Entwicklung nahmen die Zellen des gesunden Probanden dagegen unter dem Einfluß des 100 mg Glukose/ 100 ml enthaltenden Mediums nach dem Wechsel am 4. Tag. Auch dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Fibroblasten während der ersten vier Tage mit Glukose oder Galaktose ernährt worden waren.

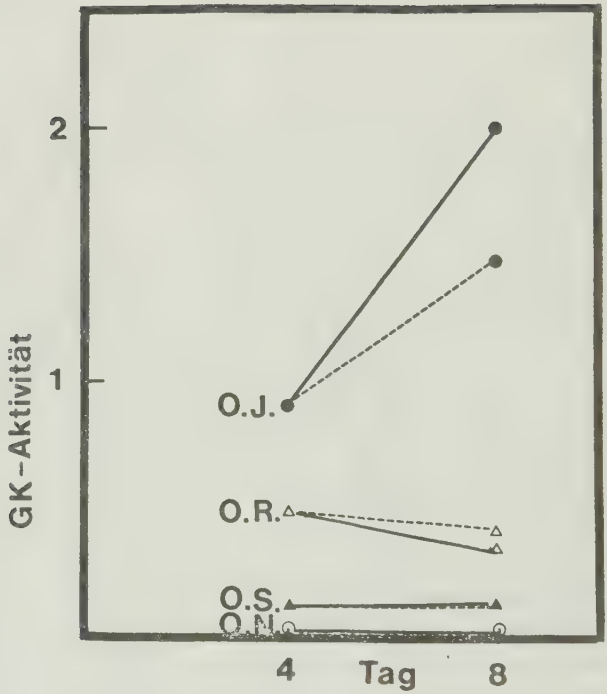

Abb. 7 c: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten.
O.J.: (●) gesunder Proband
O.R.: (△) heterozygoter GK - Defektträger
O.S.: (▲) " " "
O.N.: (○) homozygoter GK - Defektträger
Nährmedium:
siehe Abb. 7 a

Bestätigt findet man diese Ergebnisse aus Abb. 7 a und 7 b auch in den Abb. 7 c und 7 d, in denen die vom jeweiligen Medium abhängigen Galaktokinase - Aktivitäten an den Tagen verzeichnet sind, an denen die Proteinmenge ermittelt wurde.
Dabei zeigte sich in Abb. 7 c, daß bei dem Familienmitglied ohne Defekt, O.J., die Enzymaktivität in dessen Fibroblasten mit Glukose - Medium stärker zunahm, als die in den mit Galaktose ernährten Zellen. Bei den heterozygoten Defektträgern O.R. und O.S. blieb die Galaktokinase - Aktivität etwa auf dem Niveau des 4. Tages, wobei kein besonderer, von Glukose oder Galaktose ausgehender Effekt nachgewiesen werden konnte. Dies war auch bei dem homozygoten Patienten O.N. feststellbar, der weder am 4. noch am 8. Tag eine nennenswerte Aktivität aufwies.

Für die Untersuchungen, die unter Abb. 7 d dargestellt sind, wurden die aus derselben Mutterflasche stammenden Zellen wie bei Abb. 7 a und 7 c verwendet. Der Unterschied in der Durchführung gegenüber Abb. 7 c bestand darin, daß in diesem Fall von 100 mg Galaktose/ 100 ml, also ohne Glukose, als Zusatz zum Grundmedium ausgegangen wurde.
Der Enzymtest am 4. Versuchstag erbrachte ähnliche Werte, wie bei dem in Abb. 7 c geschilderten Versuch. Der Austausch der Medien an diesem Tag entsprach den bereits beschriebenen

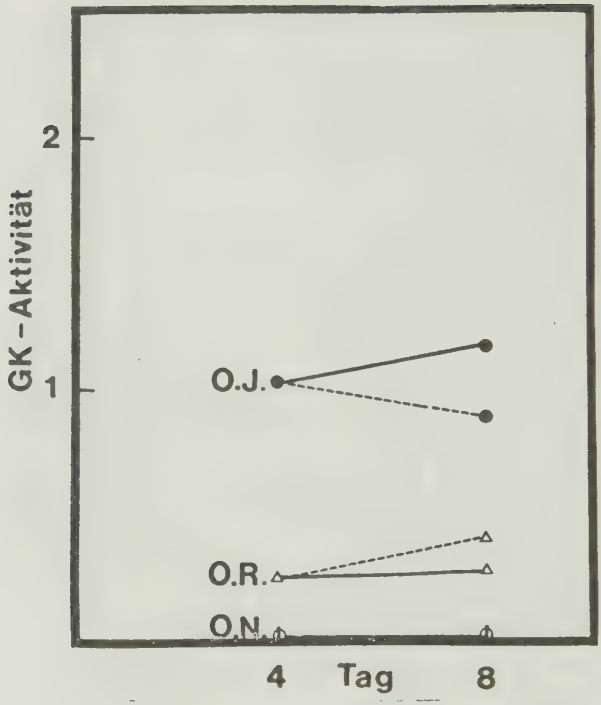

Abb. 7 d: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten.
Probanden: siehe Abb. 7 c
Nährmedium: siehe Abb. 7 b

Bedingungen.
Die Ergebnisse vom 8. Tag bestätigen den fördernden Einfluß der Glukose auf die Galaktokinase - Aktivität bei dem gesunden Probanden O.J.. Wenn auch der Glukose - bedingte Wert nur etwa 10 % über dem Niveau des 4. Versuchstages lag, so war der Unterschied zu dem um 20 % niedrigeren Galaktose - Wert doch deutlich. Bei O.R., dem heterozygoten Probanden, finden sich auch hier leicht erhöhte Werte Für Galaktose, während mit Glukose als Nährmedium das Niveau vom 4. Tag gehalten wurde. Die Fibroblasten des homozygoten O.N. zeigten auch in diesem Fall keine Enzymaktivität.

Um feststellen zu können, ob die in den Abbildungen 7 a bis 7 d gezeigten Ergebnisse spezifisch für Fibroblasten mit Galaktokinase - Defekt sind, wurden die gleichen Untersuchungen auch an Fibroblasten, die von Galaktosämie - Patienten stammten, durchgeführt.
Somit entsprechen die Versuchsbedingungen in Abb. 8 a denen in Abb. 7 a, die in Abb. 8 b denen in Abb. 7 b, usw., lediglich durch den Enzymdefekt, der die Galaktose - 1 - Phosphat-Uridyltransferase betrifft, ergibt sich ein Unterschied bei den verwendeten Zellen.
So stammen die Fibroblasten zum einen von dem Probanden K.M., der heterozygot für die klassische Galaktosämie ist, zum anderen von W.A., einem heterozygoten Träger der Duarte Variante

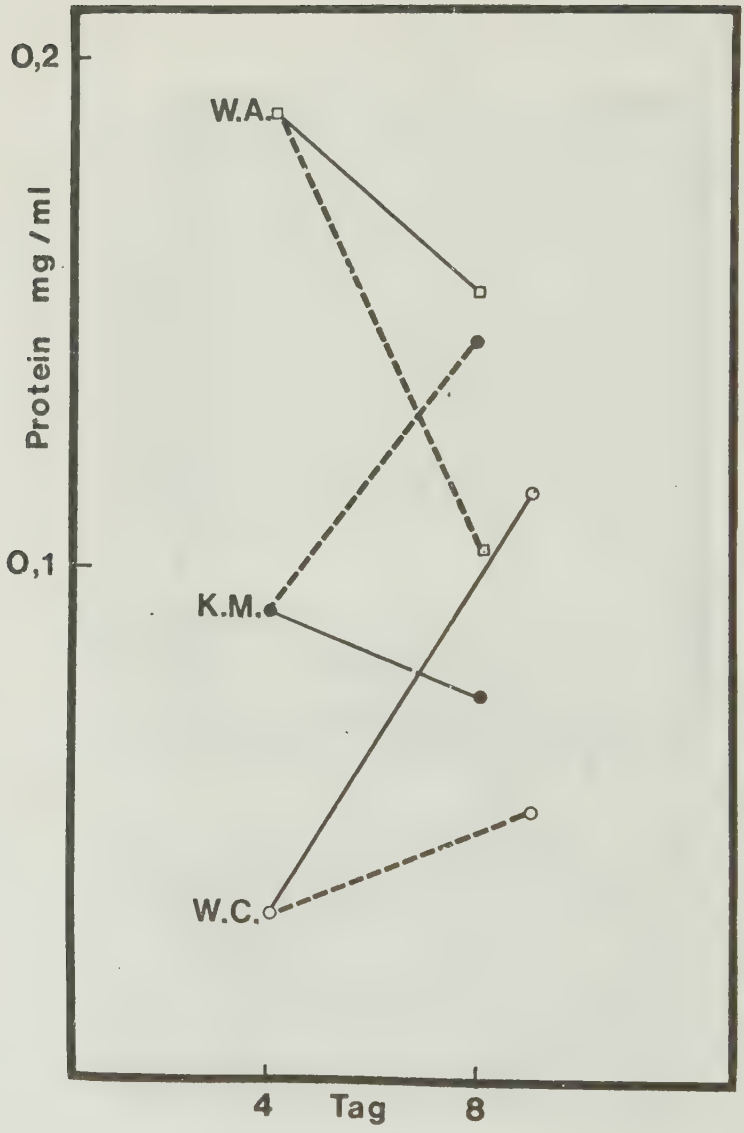

Abb. 8 a: Erläuterung siehe Seite 55

Abb. 8 a: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Proteinmenge von Fibroblasten.
W.A.: (□)heterozygot für Duart Variante
K.M.: (●) " " klass. Galaktosämie
W.C.: (○) " " " "
und für Duarte Variante
Nährmedium:
bis 4. Tag: 100 mg Glukose/ 100 ml
ab 4. Tag: 100 mg Glukose/ 100 ml (——)
bzw. 100 mg Galaktose/ 100 ml (---)

der Galaktosämie. Bei dem Patienten W.C. finden sich dagegen beide Defektausprägungen in heterozygoter Form.
Wie aus den Abbildungen 8 a und 8 b hervorgeht, liegen die Proteinwerte am 4. Versuchstag unter Glukose - Ernährung bei den Fibroblasten der heterozygoten Probanden K.M. und W.A. höher, als unter Galaktosezufuhr. Lediglich die Zellen von W.C. zeigen mit 100 mg Galaktose/ 100 ml etwas höhere Werte, als dies mit Glukosezusatz zum Medium der Fall war.
Am 8. bzw. 9. Tag, d. h. nach erneuter, viertägiger Inkubation mit 100 mg Glukose/ 100 ml oder 100 mg Galaktose/ 100 ml, zeigt sich unabhängig vom Ausgangsmedium Glukose oder Galaktose ein übereinstimmendes Bild, was den Einfluß der verschiedenen Medien auf die Proteinwerte betrifft. Die Zellen beider Probanden mit Duarte Variante, W.A. und W.C., weisen höhere Werte unter Glukose - Medium auf,

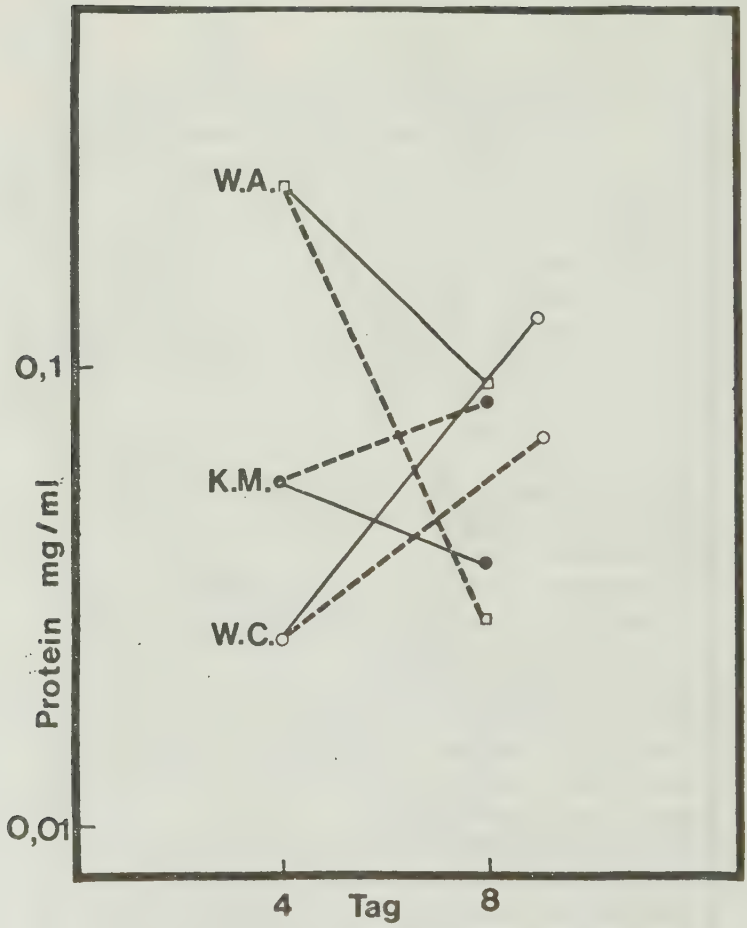

Abb. 8 b: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Proteinmenge von Fibroblasten.
Probanden: siehe Abb. 8 a
bis 4. Tag: 100 mg Galaktose/ 100 ml
ab 4. Tag: 100 mg Galaktose/ 100 ml (---)
bzw. 100 mg Glukose/ 100 ml (——)

während sich die, des für die klassische Galaktosämie heterozygoten K.M., unter 100 mg Galaktose/ 100 ml günstiger entwickeln.

Bezieht man die Ergebnisse aus Abb. 7 a und b mit ein, so läßt sich die Feststellung treffen, daß das Glukose - haltige Medium sich für die Fibroblasten der Normalperson O.J. sowie für die Träger der Duarte Variante als günstig erwiesen hat. Dabei spielt die Art des bis zum vierten Tag zur Ernährung verwendeten Zuckers keine Rolle. Dies gilt auch für die Zellen der Galaktokinase - Defekt - Patienten und des Galaktosämie - Patienten K.M., bei denen ein fördernder Einfluß der Galaktose bestätigt werden konnte.

Entsprechend den für Abb. 7 c und 7 d beschriebenen Versuchsbedingungen wurden gleichartige Untersuchungen an Zellen von Galaktosämie - Patienten durchgeführt, wobei sich folgendes ergab: Wie bei Patienten mit Galaktokinase - Defekt (Abb. 7 c und d) findet sich auch bei Galaktosämie - Patienten (Abb. 8 c und d) unabhängig davon, ob homo- oder heterozygot, eine stärkere Zunahme der Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten nach Zugabe eines Galaktose - haltigen Nährmediums, als dies nach Glukose - Ernährung der Fall ist. Für dieses am 8. bzw. 9. Tag nach Züchtungsbeginn gewonnene Resultat spielt es keine Rolle, ob während der ersten vier Tage 100 mg

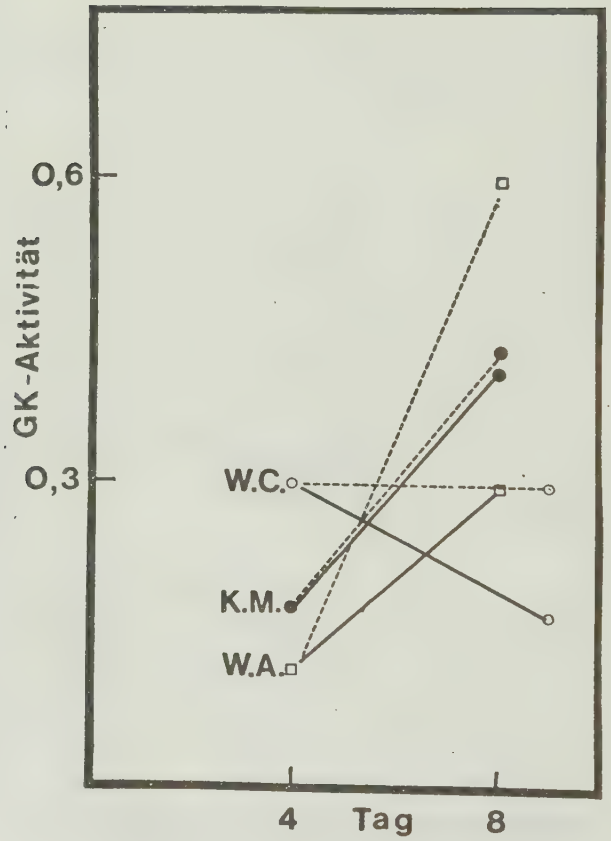

Abb. 8 c: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten.
Probanden: siehe Abb. 8 a
Nährmedium: siehe Abb. 8 a

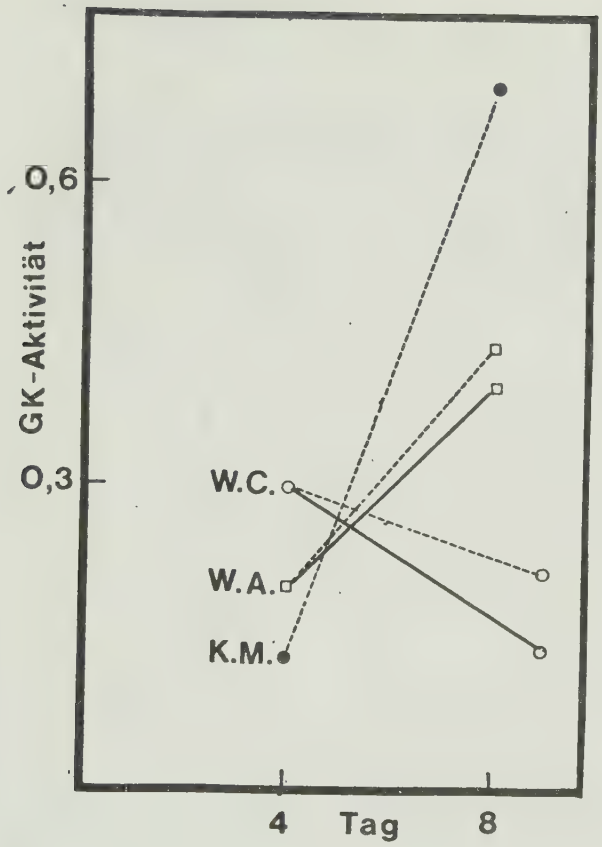

Abb. 8 d: Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten.
Probanden: siehe Abb. 8 b
Nährmedium: siehe Abb. 8 b

Glukose/ 100 ml oder 100 mg Galaktose/ 100 ml dem Grundmedium zugesetzt worden sind. Auffällig war allerdings, daß für den Patienten W.C. sowohl in Abb. 8 c als auch in Abb. 8 d eine doppelt so hohe Galaktokinase - Aktivität wie für die Probanden W.H. und K.M. gemessen wurde. Eigentlich dürfte man für alle drei Personen eine etwa gleich große Aktivität erwarten, da das Enzym Galaktokinase vom Defekt nicht betroffen ist.

D I S K U S S I O N

Die Optimierung der Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität war seit der Entdeckung des Galaktokinase - Defektes 1965 wiederholt Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Aus der Fülle von Ergebnissen sollen nur einige und zwar solche herausgegriffen werden, die auf Fibroblasten und Amnionzellen sowie Leukozyten Bezug nehmen. (Tab. 1)

A U T O R	pH - Optimum			k_M(mM) f.Galaktose			k_M(mM) f. ATP		
	F	A	L	F	A	L	F	A	L
Mayes und Guthrie(19)	7,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Tedesco und Mellman(33)	7,5	-	7,5	0,18 -0,2	-	-	0,2	-	-
Chacko et al. (4)	7,8	-	-	1,2 -2,5	-	-	0,01 -0,04	-	-
Ng et al.(23)	7,6	7,6	-	-	-	-	-	-	-
Eigene Werte	7,9	7,9	7,4 u.8,0	0,48	0,34	-	2,1	1,25	-

Tab. 1: pH - und k_M - Werte für die Galaktokinase bei verschiedenen Autoren. Fibroblasten (F), Amnionzellen (A), Leukozyten (L).

Mayes und Guthrie (19) verwendeten 1968 zur Galaktokinase - Bestimmung in Fibroblasten einen 150 mM Tris - HCl - Puffer mit einem pH - Wert von 7,8, nachdem sie bei Untersuchungen an Erythrozyten ein pH - Optimum zwischen 7,8 und 8,2 gefunden hatten. Tedesco und Mellman (33) dagegen beschrieben für Fibroblasten ebenso wie für Leukozyten ein Optimum bei pH 7,5. Benützt wurde dabei ein 200 mM Tris - HCl - Puffer mit einem pH - Wert von 7,6.
Tris - HCl - Puffer unterschiedlicher Molarität und Wasserstoffionen - Konzentration fanden auch bei den in der Folge zitierten Arbeiten Verwendung. Während Chacko et al. (4) 1972 mit einem 8 mM Puffer in Fibroblasten ein Optimum bei pH 7,8 nachwiesen, führten Ng et al. (23) ihre in diesem Jahr veröffentlichten Untersuchungen an Amnionzellen und Fibroblasten mit einem Puffer durch, der bei 0,01 mM Tris - HCl auf 0,15 ml Gesamtvolumen einen pH - Wert von 7,6 besaß.
Diese Ergebnisse decken sich nur in begrenztem Umfang mit denen, die die vorliegende Arbeit erbracht hat. Eine Übereinstimmung mit dem zitierten Schrifttum (Tab. 1) wird, wenn auch nur annähernd, bei dem pH - Wert für Fibroblasten gefunden, wofür unter Verwendung eines 0,25 M Tris - HCl - Puffers ein Optimum von 7,9 gefunden wurde.
Unterschiede waren dagegen für Amnionzellen feststellbar, bei denen das Optimum in Abhängigkeit von der morphologischen Differenzie-

rung bei pH 7,9 bzw. 8,0 lag, während Ng et al. (23) von einem Wert von 7,6 ausging.
Ein in Gegensatz zu den Ergebnissen Tedescos und Mellmans stehendes Resultat erbrachten die Untersuchungen an Leukozyten. Zwar stimmten auch hier die Optima mit pH 7,4 in dieser und mit pH 7,5 in der amerikanischen Arbeit annähernd überein, doch konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß ein zweiter Gipfel bei pH 8,0 existiert. Für diesen Punkt der Kurve (Abb. 3) wurden ca. 82 % der bei pH 7,4 vorhandenen Galaktokinase - Aktivität ermittelt, während der tiefste Punkt zwischen den beiden Gipfeln mit etwa 64 % bei pH 7,8 lag und bei pH 8,1 mit 76 % eine erneute Abnahme nach dem zweiten Optimum festgestellt wurde. Tedesco und Mellman beschrieben dagegen eine kontinuierliche Abnahme der Enzymaktivität nach Erreichen des Optimums bei pH 7,5.
Wenngleich sich die festgestellten kleineren Abweichungen noch als vom Labor und den dort angewandten Versuchsbedingungen abhängig erklären lassen, trifft dies für den deutlich anderen Verlauf der pH - Kurve bei Leukozyten nicht zu. Da jedoch die verwendeten Leukozyten keine homogene Population (es sind auch Lymphozyten enthalten) darstellen, könnte das durch die enge Staffelung der Puffer - pH - Werte in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte zweite Optimum eventuell auf die übrigen Zellbestandteile zurückgeführt werden.

Der Vergleich der ermittelten k_M - Werte der Galaktokinase mit dem internationalen Schrifttum (Tab. 1) erbrachte ebenso Übereinstimmungen in einigen Punkten wie Gegensätzliches.

Der aus Abb. 4 a erhaltene, für Fibroblasten unter Verwendung von Galaktose als Substrat gültige k_M - Wert von 0,48 mM entspricht ungefähr dem Ergebnis von Tedesco und Mellman (33), die k_M - Werte zwischen 0,18 und 0,42 mM in Abhängigkeit von der Fibroblastenkultur beschrieben. Für den Testansatz wählten sie 0,6 mM ATP und einen pH - Wert von 7,6, während die vorliegende Untersuchung von 2 mM ATP und einem pH von 7,9 ausgeht.
Einen Tris - HCl - puffer mit pH 7,8 und 1,5 mM ATP benutzte Chacko et al. (4) beim Nachweis eines k_M - Wertes von 1,95 mM $\pm$ 0,73 mM, der sich deutlich von den anderen abhebt.
Ein ebenso gravierender Unterschied fand sich auch bezüglich der k_M - Werte der Kinase für ATP dieser Veröffentlichung gegenüber Tedescos und meinen Beobachtungen, die aufgrund abweichender Testansätze um eine Zehnerpotenz differieren. Chacko beschrieb bei pH 7,8 und 1 mM Galaktose einen k_M - Wert von $3,3 \times 10^{-2}$ $\pm$ $1,15 \times 10^{-2}$ mM, bei Tedesco fand sich mit pH 7,6 und 0,4 mM Galaktose ein Wert von 0,2 mM, während mein von der 25 - fachen Galaktosekonzentration ausgehender Versuch bei pH 7,9 einen k_M - Wert von 2,1 mM erbrachte.
Ein Schluß bezüglich der Richtigkeit einzelner

k_M - Werte läßt sich aufgrund der Verschiedenheit der Ausgangssituation nicht ziehen, so daß jedes Ergebnis als für die jeweilige Testbedingung zutreffend angesehen werden muß.
Dies gilt auch für die im Zuge dieser Arbeit an Amnionzellen ermittelten k_M - Werte, die für das Substrat Galaktose bei 2 mM ATP 0,34 mM und für ATP bei 10 mM Galaktose und einem pH - Wert von 7,9 1,25 mM betragen.

Ein weiterer zur Diskussion stehender Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der Enzymaktivität der Galaktokinase in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der menschlichen Fibroblasten und Amnionzellen. Bereits 1969 waren von Tedesco und Mellman (33) ähnliche Untersuchungen an Fibroblasten mit dem Ergebnis durchgeführt worden, daß nämlich die Galaktokinase in Fibroblasten etwa 10 Tage nach Beginn der Kultivierung ihre maximale Aktivität erreicht. Dies entspricht auch meinen Beobachtungen, die sich in Bezug auf die Abnahme der Enzymaktivität nach dem 10. Tag mit den Angaben der oben aufgeführten Autoren decken. Ferner konnten meine Untersuchungen Aufschluß darüber erbringen, wie sich die Galaktokinase in Amnionzellen während der Züchtung verhält. Sie zeigte dabei einen verlangsamten Anstieg, erreichte erst etwa am 15. Tag das Optimum, das aber dennoch nur die Hälfte der bei Fibroblasten vorkommenden spezifischen Aktivität besaß.

Ein Unterschied besteht jedoch darin, daß Tedesco und Mellman bereits am 3. Tag nach Züchtungsbeginn in Fibroblasten eine Enzymaktivität von über 75 % der am 10. Tag erreichten Werte ermittelten, während meine Ergebnisse sowohl für die Fibroblasten als auch für die Amnionzellen 25 % am 3. Tag zeigten. Die Darstellungen der von der Kultivierungsdauer abhängigen Proteinmenge entsprechen sich dagegen in beiden Untersuchungen annähernd.

Angeregt durch zahlreiche Untersuchungen über das Wachstumsverhalten von Fibroblasten einiger Galaktosämie - Patienten, wollte die vorliegende Arbeit Aufschluß darüber erbringen, welchen Einfluß ein Glukose- oder Galaktose - haltiges Nährmedium auf das Wachstum von Fibroblasten, die von Patienten mit Galaktokinase - Defekt stammten, ausübt.
Zu diesem Zweck wurde am 4. und 8. bzw. 9. Tag nicht nur die für den Versuch verwendete Proteinmenge bestimmt, sondern auch die Aktivität der Galaktokinase ermittelt. Als Ausgangsmaterial fanden neben Fibroblasten von Normalpersonen auch solche Verwendung, die von Probanden stammten, die entweder für die Galaktosämie oder den Galaktokinase - Defekt homo- bzw. heterozygot waren.

An Fibroblasten von Galaktosämie - Patienten hatten bereits 1961 Krooth und Weinberg (14) Nährmedien - abhängige Effekte auf das Wachs-

tum nachgewiesen, wozu sie neben Hexose - freien Medien, solche mit 5 mg % Glukose, 95 mg % Galaktose gemischt mit 5 mg % Glukose, und solche mit 100 mg % Glukose bzw. Galaktose verwendeten.
Nach Messung der Proteinmengen stellten sie für homozygote Zellreihen fest, daß die Nicht-Galaktosämie - Zellen sowohl in 100 mg % Galaktose als auch in der entsprechenden Glukosekonzentration ähnliches Wachtum zeigten, während die Galaktosämie - Fibroblasten in 100 mg % Glukose besser wuchsen.
Die an heterozygoten Zellen durchgeführten Untersuchungen erbrachten dagegen kein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Die eventuell auftretende Zellschädigung durch Galaktose kann, wie Krooth in seiner 1966 erschienenen Veröffentlichung (15) darlegte, dadurch vermieden werden, daß man die Fibroblasten bereits vor den Versuchen an Galaktose adaptiert.
Tedesco's und Mellman's Beobachtungen (33) aus dem Jahre 1969 deuteten darauf hin, daß die Galaktose für Galaktosämie - Zellen nicht schädlich zu sein scheint. Für normale Zellen wiesen sie sogar ein unbeeinflußtes Wachstum nach, obwohl die Glukose im Medium durch Galaktose ersetzt worden war. Chacko et al. (4) dagegen fanden eine Wachstumshemmung bei Fibroblasten von Galaktosämie - Patienten, als sie 100 mg % Galaktose zugaben, während sich die spezifische Aktivität der Galaktokinase nicht änderte.
Neue Erkenntnisse dazu erbrachte die Veröffent-

lichung Petriccianis (25), der darlegte, daß bei entsprechenden Glukosemengen die Galaktose - Utilisation sowohl in normalen als auch in Zellen mit Transferase - Defekt erheblich behindert wird. Ferner konnte diese Arbeit einen Hinweis auf einen alternativen, nur in Zellen von Galaktosämie - Patienten vorkommenden Stoffwechselweg erbringen, der durch Mayes und Miller (20) als Dephosphorylierung des durch Galaktokinase gebildeten Galaktose - 1 - Phosphats diskutiert wurde.

Erst die Kenntnis aller oben angeführten Sachverhalte läßt die Erörterung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Thema der Medienabhängigen Beeinflussung der Galaktokinase - Aktivität in Fibroblasten verschiedenen Genotyps und unterschiedlichen Krankheitsbildes sinnvoll erscheinen.
So findet sich, wenn man von der Galaktokinase - Aktivität auf die Einflußnahme schließt, folgendes Bild: Bei normalen Fibroblasten ohne Defekt läßt sich eine günstigere Entwicklung unter Glukose feststellen, bei Zellen von hetero- und homozygoten Galaktokinase - Patienten ist kein abweichender Effekt der beiden Zucker erkennbar, während die Galaktose bei Galaktosämie - Zellen einen positiven Einfluß besitzt. Diese Beobachtungen unterscheiden sich allerdings von denen, die bei der Bestimmung der Proteinwerte gemacht wurden. Der begünstigende Einfluß der Glukose als Zusatz zum

Medium ist zwar auch bei den Proteinmengen der gesunden Fibroblasten nachweisbar, ebenso der fördernde Galaktose - Effekt auf die Zellen mit heterozygoter klassischer Galaktosämie, doch ändern sich die Verhältnisse bei den Galaktokinase - Defekt - Zellen sowie bei den Fibroblasten mit der Duarte Varinate der Galaktosämie. Höhere Proteinwerte unter Zusatz von Galaktose weisen daher die Fibroblasten der Patienten auf, die entweder hetero- oder homozygote Träger des Galaktokinase - Defektes sind. Dieser Effekt bleibt ungeklärt, zumal Friedman (6) eine nachweisbare Galaktokinase - Aktivität zur Bedingung einer Galaktose - Aufnahme in die Zelle macht.
Der bereits von Krooth und später von Chacko beschriebene günstigere Einfluß von Glukose auf die Galaktosämie - Zellen wird auch in der vorliegenden Arbeit sowohl an den Zellen eines heterozygoten Trägers der Duarte Variante und der klassischen Galaktosämie als auch an denen eines ausschließlich für die Duarte Variante Heterozygoten deutlich.
Alle angeführten Beobachtungen erwiesen sich als unabhängig davon, ob die Fibroblasten an den jeweiligen Zucker adaptiert, d. h. während der ersten vier Tage in Glukose - oder Galaktose - haltigem Nährmedium gezüchtet wurden, wenngleich Krooth (15) einen gegenteiligen Effekt beschrieb.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Aufgabe dieser vorliegenden Arbeit bestand im wesentlichen darin, neben kinetischen Eigenschaften des Enzyms Galaktokinase in Leukozyten, Amnionzellen und Fibroblasten die Bestimmung der Galaktokinase - Aktivität und der Proteinmenge in Abhängigkeit vom Wachstum der Zellen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen durchzuführen.
Mit Ausnahme des zweigipfeligen pH - Optimums für die Enzymaktivität bei Leukozyten war eine weitgehende Übereinstimmung der pH - Werte bei Amnionzellen und Fibroblasten mit den Angaben verschiedener Autoren feststellbar, während die ermittelten k_M - Werte für die Substrate Galaktose und ATP in den divergierenden Literaturwerten (Tab. 1) nur begrenzt Bestätigung fanden. (Abb. 2 und 3).
Versuche, die die Abhängigkeit der Galaktokinase - Aktivität von der Kultivierungsdauer klären sollten, zeigten eine 4 - fache Zunahme der Enzymaktivität bei Erreichen des höchsten Wertes sowohl für Fibroblasten als auch für Amnionzellen, deren Kurve mit einem weniger steilen Verlauf ein um 5 Tage länger dauerndes Wachstum zeigten. (Abb. 4 bis 6).
Der Wechsel des Nährmediums von Glukose- zu Galaktose - haltig bzw. umgekehrt erbrachte schließlich für normale Fibroblasten eine höhere Enzymaktivität unter Glukose - Zufuhr, gleiches Verhalten beider Zucker in Zellen

von Galaktokinase - Patienten, während Galaktose sich als günstiger für Fibroblasten von Galaktosämie - Patienten erwies. (Abb. 7 bis 8).

L I T E R A T U R

1. Beutler, E., M. C. Baluda, P. Sturgeon, R. W. Day: The Duarte Variante of galactose - 1 - phosphate uridyl transferase: aprevalen allele of gene for galactosemia. J. clin. Invest. 44 (1965), 1028

2. Beutler, E., M. C. Baluda: A simple screening spottest for galactosemia. J. Lab. clin. Med. 68 (1966), 137

3. Beutler, E., N. V. Paniker, F. Trinidad: The assay of red cell galactokinase. Biochem. Med. 6 (1971), 325

4. Chacko, C. M., L. McCrone, H. Nadler: A study of galactokinase and glucose 4 - epimerase from normal and galactosemic skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 284 (1972), 552

5. Fanconi, G.: Hochgradige Galaktose - Intoleranz (Galaktose - Diabetes) bei einem Kind mit Neurofibromatose Recklinghausen. Jb. Kinderheilk. 138 (1933), 1

6. Friedman, T. B., R. J. Yarkin, C. R. Merril: Galactose and glucose metabolism in galactokinase deficient, galactose - 1 - P - uridyl transferase deficient and normal human fibroblasts. J. Cell. Physiol. 85 (1974), 569

7. Gitzelmann, R.: Deficiency of erythrocyte galactokinase in a patient with galactose diabetes. Lancet 2 (1965), 670

8. Gitzelmann, R.: Hereditary galactokinase deficiency, a newly recognized cause of juvenile cataracts. Ped. Res. 1 (1967), 14

9. Guthrie, R.: Glucose supplementation method for confirmation of inhibitory substance as galactose in galactosemia test. Progress Report, July 1966 (a leaflet)

10. Hoehn, H., E. M. Bryant, L. E. Karp, G. M. Martin: Cultivated cells from diagnostic Amniocentesis in second trimester pregnancies. I. clonal morphology and growth Potential. Pediat. Res. 8 (1974), 746

11. Kalckar, H. M., E. P. Andersone, K. J. Isselbacher: Galactosemia, a congenital defect in nucleotide transferase. Biochim. Biophys. Acta 20 (1956), 262

12. Kinoshita, J. H., L. O. Merola, E. Dikmak: Osmotic changes in experimental galactose cataracts. Exp. Eye Res. 1 (1962), 405

13. Komrower, G. M., V. Schwarz, A. Holzel, L. Golberg: A clinical and biochemical study of galactosemia. A possible explanation of

the nature of the biochemical lesion. Arch. Diss. Childh. 31 (1956), 254

14. Krooth, R. S., A. N. Weinberg: Studies on cell lines developed from the tissues of patients with Galactosemia. J. Exp. Med. 113 (1961), 1155

15. Krooth, R. S.: Some properties of diploid cell strains developed from the tissues of patients with inherited biochemical disorders. In Vitro 2 (1966), 82

16. Lineweaver, H., D. Burk: The determination of enzyme dissociation Constants. J. Amer. chem. Soc. 56 (1934), 658

17. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall: Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951), 265

18. Mathai, C. K., E. Beutler: Electrophoretic variation of galactose - 1 - phosphate uridyl transferase. Science 154 (1966), 1179

19. Mayes, J. S., R. Guthrie: Detection of heterozygotes for galactokinase deficiency in a human population. Biochem. Gen. 2 (1968), 219

20. Mayes, J. S., L. R. Miller: The metabolism

of galactose by galactosemic fibroblasts in vitro. Biochim. Biophys. Acta 313 (1973),9

21. Michaelis, L., M. L. Menten: Die Kinetik der Invertwirkung. Biochem. Z. 49 (1913), 333

22. Ng, W. G., G. N. Donnell, W. R. Bergren: Galactokinase activity in human erythrocytes of individuals of different ages. J. Lab. Clin. Med. 66 (1965), 115

23. Ng, W. G., G. N. Donnell, W. R. Bergren, O. Alfi, M. S. Golbus: Prenatal diagnosis of galactosemia. Clin. Chim. Acta 74 (1977), 227

24. Pau, H. R., R. Kuhlmann, J. Schröter: Die Kationenpumpe in ihrer Bedeutung für die Flüssigkeitsverschiebung in der Linse und die Permeabilitäts - Katarakte. Albrecht v. Graefe's Arch. Ophthal. 186 (1973), 165

25. Petricciani. J. C., M. K. Binder, C. R. Merril, M. R. Geier: Galactose utilization in Galactosemia. Science 175 (1972), 1368

26. Pickering, W. R., R. R. Howell: Galactokinase deficiency: Clinical and biochemical findings in a new kindred. J. Pediat. 81 (1972), 50

27. Reuß, A. von: Zuckerausscheidung im Säug-

lingsalter. Wien. Med. Wschr. 58 (1908), 799

28. Russell, J. D.: Variation in UDP - Glu: ∝ - D - gal - 1 - P uridyl transferase activity during growth of cultured fibroblasts. In Galactosemia D. Y. Hsia, C. C. Thomas (1969), 204

29. Sherman, J. R.: Rapid enzyme assay technique utilizing radioactive substrate, ion - exchange paper, and liquid scintillation counting. Anal. Biochem. 5 (1963), 548

30. Shin - Buehring, Y., M. Osang, J. Schaub: A Method For Galactose - 1 - Phosphate Uridyl Transferase Assay And The Separation Of Its Isozymes By DEAE - Cellulose Column Chromatography. Clin. Chim. Acta 70 (1976), 371

31. Shin - Buehring, Y., M. Osang, J. Schaub: A Simple Assay For Galactokinase Using DEAE-Cellulose Column Chromatography. Clin. Chim. Acta 74 (1977), 1

32. Shin - Buehring, Y., T. Baier, A. Tan, M. Osang, J. Schaub: The Activity of Gal - 1 - Phosphate Uridyl Transferase and Galactokinase in Human Fetal Organs. Pediat. Res. 11 (1977), 1003

33. Tedesco, T. A., W. Mellman: Galactose - 1 - Phosphate Uridyltransferase and Galactokinase Activity in Cultured Human Diploid Fibroblasts and Peripheral Blood Leukocytes. J. Clin. Invest. 48 (1969), 2390

34. Thalhammer, O., R. Gitzelmann, M. Pantlischko: Hypergalactosemia and galactosuria due to galactokinase deficiency in a newborn. Pediatrics 42 (1968), 441

L E B E N S L A U F

Am 6. Januar 1952 wurde ich in Töging, Landkreis Altötting geboren.
Nach dem Besuch der örtlichen Volksschule und des Ruperti - Gymnasiums, Mühldorf, das ich 1966 verließ, schloß ich eine Lehre zum Kaufmann im Groß- und Außenhandel mit der Gehilfenprüfung ab. Teilweise parallel zur Berufsausbildung erwarb ich an der Berufsaufbauschule Mühldorf die Mittlere Reife und trat am 1. Oktober 1970 in das Bayernkolleg Augsburg ein. Das Abitur absolvierte ich im Februar 1973 und begann im Sommersemester 1973 mit dem Studium der Humanmedizin.
Im März 1975 bestand ich an der Universität München die ärztliche Vorprüfung und im März 1976 sowie 1978 den 1. bzw. 2. Teil der ärztlichen Prüfung.